

IMPLICATION DE LA RÉGION C-TERMINALE DU VARIANT D'HISTONE H2A.Z
DANS SA LOCALISATION GÉNOMIQUE ET DANS LE CONTRÔLE DE LA
TRANSCRIPTION GÉNÉRIQUE

par

Hannah Neumann

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Novembre 2017

Le 14 novembre 2017

*le jury a accepté le mémoire de Madame Hannah Neumann
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Luc Gaudreau

Directeur de recherche

Département de biologie

Professeur Benoît Leblanc

Évaluateur interne

Département de biologie

Professeur Raymund J. Wellinger

Président-rapporteur

Département de microbiologie et d'infectiologie

SOMMAIRE

Le génome eucaryote est organisé sous forme de chromatine constituée de complexes ADN-protéines, nommés nucléosomes. Un nucléosome canonique individuel est formé d'un octamère d'histones, composé de deux dimères H2A-H2B et d'un tétramère (H3-H4)₂, enveloppé par 146 paires de bases d'ADN. Cette structure complexe de la chromatine est reconnue comme pouvant être un obstacle aux processus impliquant l'ADN, incluant la transcription des gènes. Par conséquent, les nucléosomes doivent être remodelés dans certaines régions géniques afin de rendre l'ADN accessible et de permettre l'induction de la transcription. Les nucléosomes sont sujets à plusieurs modifications qui peuvent faciliter ou inhiber le processus de transcription. Plusieurs mécanismes fondamentaux peuvent altérer la structure de la chromatine incluant le remodelage de la chromatine de manière ATP-dépendante, les modifications post-traductionnelles des histones et le remplacement des histones canoniques par des variants d'histones.

H2A.Z, un variant de l'histone canonique H2A, est conservé chez divers organismes eucaryotes, de la levure aux mammifères, et son incorporation dans la chromatine permet de créer des domaines de chromatine spécialisés. Des analyses de la localisation de H2A.Z à l'échelle du génome ont démontré que H2A.Z se trouve préférentiellement dans les régions promotrices et régulatrices des gènes. De plus, il a été démontré que H2A.Z a une importance dans la régulation positive et négative de la transcription des gènes. H2A.Z est trouvé dans les promoteurs de gènes inactifs ou très peu transcrits et on pense que les nucléosomes contenant H2A.Z forment une structure de la chromatine spéciale qui prépare les nucléosomes à être désassemblés suite à l'activation de la transcription de ces gènes. La liaison de H2A.Z aux promoteurs et dans les régions transcrites est perdue graduellement suite à l'induction de la transcription.

La divergence principale entre les protéines de H2A.Z et H2A réside dans leurs régions C-terminales contenant le domaine d'amarrage, qui ne présente que 40% d'identité de séquence entre H2A.Z et H2A. Dans le nucléosome, le domaine d'amarrage de H2A.Z contacte le tétramère H3-H4 et possède une extension de résidus acidiques de l'hélice α C continuant sur l'histone H2B et qui forment une surface d'interaction. On pense que le domaine d'amarrage de H2A.Z pourrait représenter une plateforme de liaison à des partenaires d'interaction afin de moduler les activités de remodelage de la chromatine. Le complexe SWR1 catalyse l'échange d'un dimère H2A-H2B pour un dimère H2A.Z-H2B dans un nucléosome. Lorsque la région C-terminale de H2A.Z est tronquée, il est possible d'observer une perte de l'association entre le complexe SWR1 et H2A.Z ainsi qu'une diminution de l'incorporation de H2A.Z dans la chromatine. De plus, lorsque la région C-terminale de H2A.Z est remplacée par la région correspondante de H2A, l'activation de la transcription des gènes modèles *GAL1* et *GAL10* chez la levure est compromise. De manière intéressante, l'ajout d'une région acide d'activation de la transcription à la protéine de fusion ZA permet de rétablir le niveau d'expression des gènes *GAL*, suggérant que la région C-terminale de H2A.Z possède une fonction de régulation de la transcription.

Dans le but d'étudier le rôle fonctionnel de la région C-terminale du variant d'histone H2A.Z dans sa localisation génomique et dans le contrôle de la transcription génique, nous avons utilisé des protéines de fusion dérivées de H2A.Z exprimées dans l'organisme modèle *Saccharomyces cerevisiae*. La protéine de fusion ZA contient la région N-terminale et le domaine central de H2A.Z, fusionnés avec la région C-terminale de H2A. Une région acide d'activation de la transcription provenant de l'activateur Gal4 a été fusionnée en C-terminal de la protéine ZA afin de créer la protéine de fusion ZA-rII'. Les

résultats suggèrent que la région d'activation rII' permet de mimer des interactions semblables à celles avec la région C-terminale de H2A.Z dans le nucléosome.

En comparant les distributions de H2A.Z et des protéines de fusion à l'échelle du génome, nous démontrons que la localisation de H2A.Z au niveau des promoteurs, ainsi qu'à d'autres régions précises des chromosomes et d'autres éléments transcrits, est dépendante de sa région C-terminale. La modification de la région C-terminale cause une baisse du niveau d'incorporation de H2A.Z dans la chromatine au niveau des promoteurs à l'échelle génomique, mais ne semble pas procurer une nouvelle localisation à la protéine. Nous démontrons également que la perte de la version modifiée de H2A.Z de la chromatine est indépendante de sa liaison au complexe SWR1. Nous avons identifié 2240 gènes présentant un enrichissement de H2A.Z au niveau du promoteur et les avons nommés « gènes associés à H2A.Z », 1128 gènes sont associés à ZA-rII' et 370 gènes sont associés à ZA. Nous avons observé que les gènes associés à H2A.Z sont impliqués dans plusieurs processus biologiques tels l'organisation du cytosquelette, la transcription des promoteurs reconnus par l'ARN polymérase II, le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la ségrégation des chromosomes et l'épissage de l'ARN. Des rôles pour H2A.Z ont déjà été reportés pour quelques-uns de ces processus biologiques, mais sa fonction et son mécanisme ne sont pas bien compris. Alors que quelques processus sont conservés pour les gènes associés à ZA-rII', par exemple la transcription des promoteurs reconnus par l'ARN polymérase II, l'organisation de la chromatine, la biogenèse des complexes protéiques et le silençage de la chromatine, la plupart des processus sont perdus pour les gènes associés à ZA. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que les gènes associés à H2A.Z codant des protéines impliquées dans ces processus sont potentiellement des gènes régulés de manière transcriptionnelle par la région C-terminale de H2A.Z. De manière intéressante, nous démontrons que l'expression des gènes impliqués dans les processus enrichis pour les gènes associés à H2A.Z est dérégulée lorsque la région C-terminale de H2A.Z est modifiée. L'expression des protéines ZA et ZA-rII' cause une expression augmentée ou une réduction de l'expression des gènes par rapport à H2A.Z, ce qui n'est

pas surprenant compte tenu du fait que H2A.Z est impliqué dans la régulation positive et négative de l'expression génique. De plus, nous observons qu'environ le quart des gènes essentiels chez la levure sont des gènes associés à H2A.Z et que la modification de la région C-terminale de H2A.Z affecte également leur expression.

Bien que le mécanisme d'action de H2A.Z dans le contrôle de la transcription ne soit pas tout à fait établi, cette étude permet de faire un rapprochement entre la localisation spécifique de H2A.Z aux promoteurs et son implication dans la régulation de la transcription. Plusieurs études ont démontré qu'une dérégulation de H2A.Z pouvait être impliquée dans le développement de certains cancers. Par exemple, une surexpression ou une expression réduite du variant d'histone H2A.Z peuvent mener à un cancer du sein ou du côlon. Dans cette étude, nous démontrons que la modification de la région C-terminale de H2A.Z entraîne des changements d'expression génique pouvant affecter plusieurs processus biologiques, tels que la réparation de l'ADN, la progression et régulation du cycle cellulaire et la mitose, souvent débalancés dans la carcinogenèse. Pour la première fois, nos résultats mettent en évidence un potentiel rôle transcriptionnel global pour la région C-terminale de H2A.Z.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche Luc Gaudreau pour m'avoir acceptée dans son laboratoire pour y réaliser des stages, des crédits de recherche et finalement, ma maîtrise. Je suis reconnaissante pour les opportunités qu'il m'a offertes, que ce soit l'implication dans différents projets, les participations à des congrès ou les collaborations, et pour m'avoir conféré la liberté d'orienter mon projet de maîtrise. Les années passées dans le laboratoire de Luc représentent mes premières années de recherche, celles qui m'ont intéressée à la recherche en biologie, qui m'ont permis de confirmer ma passion pour ce domaine et celles qui façonnent le début de ma carrière en recherche.

Je souhaite remercier mes conseillers de maîtrise, Raymund J. Wellinger et Benoît Leblanc, qui m'ont suivie au cours de ces deux années. Ils ont su me guider tout au long de mon apprentissage de par leurs questions intéressantes et pertinentes sur mon sujet de recherche. J'aimerais également remercier Alexandre Maréchal pour son aide constante pour l'application de la méthode BioID chez la levure et pour ses conseils et les discussions lors des réunions de groupe qui auront certainement aidé à l'avancement de mon projet.

Finalement, je souhaite remercier tous les membres du laboratoire Gaudreau pour leurs conseils et les discussions autour d'une bonne bière! J'aimerais remercier spécialement Benoît Guillemette et Jean-François Millau pour les connaissances théoriques et pratiques dont ils m'ont fait profiter au cours des années et pour m'avoir aidé à développer ma pensée et ma rigueur scientifique.

TABLE DES MATIERES

Sommaire	i
Remerciements.....	v
Table des matières	vi
Liste des abréviations	ix
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Chapitre 1.....	1
Introduction GÉNÉRALE	1
1.1 La transcription chez les eucaryotes.....	2
1.1.1 Architecture des promoteurs eucaryotes.....	3
1.1.2 L'ARN polymérase II	5
1.1.3 Le complexe de préinitiation de la transcription	8
1.2 La chromatine	11
1.2.1 Les histones et le nucléosome	12
1.2.1.1 Les variants d'histone	15
1.2.2 Les modifications de la chromatine.....	20
1.2.2.1 Les modifications post-traductionnelles des histones.....	21
1.2.2.2 Les complexes de remodelage ATP-dépendants	28
1.3 Le variant d'histone H2A.Z	33
1.3.1 Biologie et fonctions de H2A.Z.....	35
1.3.1.1 Structure des nucléosomes contenant H2A.Z	38
1.3.2 Incorporation spécifique et localisation génomique de H2A.Z	41
1.3.2.1 Recrutement de coactivateurs aux promoteurs menant à l'incorporation locale de H2A.Z	41
1.3.2.2 Localisation génomique de H2A.Z.....	48
1.3.3 Implication de H2A.Z dans la régulation de la transcription.....	53
1.3.3.1 Rôle de H2A.Z dans la régulation de la transcription selon sa localisation génomique	54
1.3.3.2 Rôle de H2A.Z dans le recrutement de protéines nucléaires menant à la régulation de la transcription.....	60
1.3.3.3 Évincement de H2A.Z de la chromatine suite à l'induction de la transcription	63

1.4 Description du projet de recherche.....	70
Chapitre 2.....	73
Matériels et méthodes.....	73
2.1 Souches de levures et plasmides	73
2.2 Immunobuvardage de type Western.....	73
2.3 Essais phénotypiques.....	74
2.4 Essais d'expression (extraction d'ARN, transcription inverse et PCR quantitative).....	75
2.5 Co-immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)	76
2.6 Co-immunoprécipitation de la chromatine couplées aux puces à ADN (ChIP-chip)	77
2.7 Développement et optimisation d'un protocole pour l'application de la méthode de protéomique BioID chez la levure	78
Chapitre 3.....	82
Description de l'article et contribution.....	82
The H2A.Z C-terminal docking domain couples H2A.Z dynamics at gene promoters and transcriptional outcome in yeast	85
ABSTRACT	86
Introduction	87
Materials and methods.....	92
Yeast strains and plasmids.....	92
Phenotypic assays.....	92
qRT-PCR.....	93
Chromatin immunoprecipitations and ChIP-chip.....	93
ChIP-chip data analysis	94
Results.....	95
The C-terminus of H2A.Z is required for H2A.Z function in <i>GALI</i> gene induction and resistance to genotoxic stress.....	95
Genome-wide location analysis of H2A.Z, ZA and ZA-rII'.....	98
The genome-wide location of H2A.Z at gene promoters is dependent on its C-terminal region.....	101
H2A.Z and ZA-rII' occupy TFIID-enriched promoters of inactive or weakly transcribed genes.....	106
A global role for the H2A.Z C-terminal docking domain in gene transcription regulation in several biological processes	109

Discussion	117
References	125
Chapitre 4.....	131
Résultats	131
4.1 Application de la méthode BioID à l'étude des protéines interagissant avec la région C-terminale de H2A.Z.....	131
4.2 L'enzyme mutée BirA* (mutation R118G) perd sa spécificité et biotinyle les protéines avoisinantes chez la levure.....	136
4.3 Biotinylation par le protéine de fusion BirA*H2A.Z	138
4.4 Régulation temporelle de la biotinylation	141
4.5 Optimisation du protocole de purification des protéines biotinylées chez la levure.....	144
Chapitre 5.....	146
Discussion générale et conclusion.....	146
Chapitre 6.....	153
Perspectives	153
BIBLIOGRAPHIE	158

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARN pol II	ARN polymérase II
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transfert
C-terminal	Carboxy-terminal
FGT	Facteurs généraux de transcription
HU	Hydroxyurée
N-terminal	Amino-terminal
RT	Transcription inverse
PB	Paires de bases d'ADN
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PIC	Complexe de préinitiation de la transcription (« Preinitiation Complex »)
SAGA	Spt-Ada-Gcn5-acétyltransférase
TAFs	Facteurs associés à TBP
TBP	Protéine liant la boîte TATA
UAS	Séquence activatrice en amont
URS	Séquence répressive en amont
°C	degrés Celsius

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Résumé des variants d'histone chez l'humain et des facteurs associés	16
Tableau 1.2	Résumé des liens entre les variants d'histones et leurs facteurs associés et les différentes maladies associées chez l'humain	18
Tableau 1.3	Les différentes classes d'histones acétyltransférases (HATs)	24
Tableau 1.4	Les différentes classes d'histones déacétyltransférases (HDACs)	25
Tableau 1.5	Les différentes fonctions biologiques de H2A.Z spécifiques aux diverses espèces	37
Tableau 2.1	Anticorps utilisés dans cette étude	74
Tableau 3.1	Gene Ontology term enrichment for H2A.Z-associated genes	110
Tableau 3.2	Gene Ontology term enrichment for ZA-rII'-associated genes	111
Tableau 3.3	Gene Ontology term enrichment for ZA-associated genes	112
Tableau 3.4	Comparison of Gene Ontology term enrichment for H2A.Z, ZA and ZA-rII'-associated genes	112
Tableau 3.5	Comparison of Gene Ontology term enrichments for nonessential and essential H2A.Z, ZA and ZA-rII'-associated genes	115
Tableau 4.1	Les applications de la méthode BioID chez différentes espèces	132

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Les sous-unités et l'assemblage de l'ARN polymérase II	7
Figure 1.2	Représentation schématique des niveaux de compaction de l'ADN	12
Figure 1.3	Organisation de la particule de coeur du nucléosome	14
Figure 1.4	Les modifications post-traductionnelles des histones	22
Figure 1.5	La famille d'ATPases Snf2	30
Figure 1.6	Localisation des segments divergeant considérablement de H2A dans la structure secondaire de H2A.Z	39
Figure 1.7	Conservation de la structure et fonction de l'histone acétyltransférase NuA4 et du complexe ATP-dépendant remodeleur de la chromatine SWR1 de la levure aux humains	44
Figure 1.8	Coopération entre le complexe SWR1 et l'histone acétyltransférase NuA4 pendant la régulation de la transcription	46
Figure 1.9	Schéma récapitulatif de la localisation de H2A.Z à l'échelle du génome chez <i>S. cerevisiae</i>	50
Figure 1.10	Comparaison de la localisation de H2A.Z à un gène HZAD et non-HZAD par la méthode d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) couplée à la puce à ADN	51
Figure 1.11	Schéma décrivant les étapes de l'activation de la transcription des gènes inductibles	55
Figure 1.12	Les nucléosomes contenant H2A.Z aux promoteurs influencent la stabilité nucléosomale et l'état transcriptionnel	56
Figure 1.13	Modèle schématique décrivant les activités de FACT et Spt6 dans le maintien de l'état épigénétique et dans la protection contre l'initiation de la transcription cryptique	67
Figure 1.14	Modèle revisité du cycle d'histones	70
Figure 3.1	The C terminus of H2A.Z is required for H2A.Z special function	97
Figure 3.2	Genome-wide location analysis of H2A.Z, ZA and ZA-rII'; a zoom on chromosome III	99
Figure 3.3	H2A.Z, ZA and ZA-rII' occupancies at particular chromosome elements and other transcribed elements	101
Figure 3.4	H2A.Z and ZA-rII' are enriched in promoter regions compared with coding regions	104
Figure 3.5	The modification of the C-terminus of H2A.Z causes a SWR1-C independent loss of localization at promoters	107
Figure 3.6	H2A.Z and ZA-rII' occupy TFIID-enriched promoters of inactive or weakly transcribed genes	108

Figure 3.7	The modification of the H2A.Z C-terminal docking domain affects positively and negatively the expression of nonessential and essential genes in yeast	116
Figure 4.1	Représentation schématique de l'application de la méthode BioID	135
Figure 4.2	L'enzyme mutée BirA* perd sa spécificité et biotinyle les protéines avoisinantes	137
Figure 4.3	La fusion BirA*H2A.Z est incorporée dans la chromatine au locus <i>DAL5</i>	140
Figure 4.4	Régulation temporelle et par la concentration de biotine dans le milieu de la biotinylation chez la levure	143
Figure 4.5	Efficacité de la purification des protéines biotinylées	145

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le génome eucaryote est organisé sous forme de chromatine dont l'unité de base est le nucléosome. Ces complexes composés d'ADN et d'histones permettent la compaction du génome dans le noyau d'une cellule. La structure complexe de la chromatine représente une barrière aux processus impliquant l'ADN tels que la transcription génique, la réplication et la réparation de l'ADN. Ainsi, la cellule possède plusieurs mécanismes pouvant altérer la structure de la chromatine et rendre l'ADN accessible à certaines machineries nucléaires. Par exemple, les modifications post-traductionnelles des histones permettent d'altérer les propriétés et les partenaires d'interaction des nucléosomes. Également, le remodelage de la chromatine de manière ATP-dépendante permet de glisser des nucléosomes le long de l'ADN, de transférer des nucléosomes, d'évincer des nucléosomes de la chromatine ou d'incorporer des variants d'histones. Plus particulièrement, le remplacement des histones canoniques par des variants d'histones permet de créer des domaines de chromatine spécialisés pouvant être permissif aux processus impliquant l'ADN. Entre autres, l'incorporation de H2A.Z, un variant de l'histone canonique H2A, au niveau des régions promotrices créerait un domaine chromatinien spécialisé qui maintiendrait la chromatine dans un état permissif et permettrait de réguler la transcription génique.

Les sections qui suivent introduisent la transcription génique chez les eucaryotes, la composition et l'organisation de la chromatine ainsi que les mécanismes pouvant altérer sa structure. La biologie du variant d'histone H2A.Z, son mécanisme d'incorporation dans

la chromatine, sa localisation génomique ainsi que son rôle dans la régulation de la transcription génique sont également décrits.

1.1 La transcription chez les eucaryotes

Le génome contient l'ensemble du matériel génétique d'une espèce codé dans son acide désoxyribonucléique (ADN) et organisé sous forme de chromatine. Le génome est composé de séquences codantes, transcrites en ARN messager (ARNm) et traduites en protéines, et des séquences non codantes, qui ne sont pas transcrites ou transcrites en acide ribonucléique (ARN), mais non traduites. Le gène est l'unité de base d'hérédité qui détermine un trait précis de l'organisme et est représenté par une séquence d'ADN responsable de la synthèse d'un ARN donné. La transcription est un mécanisme moléculaire qui permet d'exprimer les gènes en les copiant sous forme d'ARN. Les ARN messagers sont ensuite reconnus par la machinerie de traduction afin d'assembler les acides aminés en protéines selon le code génétique. La transcription chez les eucaryotes diffère en plusieurs aspects de la transcription chez les procaryotes. Entre autres, la transcription se déroule dans le noyau chez les eucaryotes et à cause de la structure complexe de la chromatine, l'ADN doit être décompacté afin de rendre les régions promotrices et régulatrices accessibles à la machinerie de transcription. La transcription implique plusieurs protéines essentielles et nécessite la contribution de facteurs de transcription chez les eucaryotes. Le processus de transcription est soumis à plusieurs niveaux de régulation afin de permettre une modulation de l'expression génique et permettre à la cellule de s'adapter rapidement à son environnement.

Chez les eucaryotes, la transcription est catalysée par des enzymes clés nommées ARN polymérases et il en existe trois types nucléaires, soient l'ARN polymérase I, II et III. L'ARN polymérase I est composée de 14 sous-unités dont 12 sont identiques ou similaires aux sous-unités des ARN polymérases II et III. Les deux autres sous-unités de l'ARN pol I sont semblables à des facteurs d'initiation associés à l'ARN pol II. L'ARN pol I est située dans le nucléole et transcrit uniquement et presque tous les ARN ribosomiaux, c'est-à-dire les ARNr 28S, 5.8S et 18S. Contrairement aux autres ARNr, l'ARNr 5S est transcrit par l'ARN pol III qui est également responsable de la transcription des ARN de transfert (ARNt) et d'autres petits ARN. Les gènes transcrits par l'ARN pol III constituent des gènes domestiques ou « housekeeping genes » dont l'expression est requise par tous les types cellulaires et dans plusieurs conditions environnementales. Finalement, l'ARN pol II est responsable de la transcription de tous les gènes permettant la synthèse d'ARNm codant des protéines ainsi que certains petits ARN nucléaires (ARNsn). L'ARN pol II est composée de 12 sous-unités et requiert une association avec des facteurs de transcription afin de lier l'ADN au niveau des promoteurs et initier la transcription.

1.1.1 Architecture des promoteurs eucaryotes

Les promoteurs sont des séquences d'ADN situé à proximité des gènes, normalement en amont du site d'initiation de la transcription, où se fixe initialement l'ARN polymérase afin de démarrer la transcription de l'ADN en ARN. La plupart des promoteurs eucaryotes de classe II possèdent des éléments du coeur du promoteur et des éléments régulateurs (Struhl, 1995).

Le coeur du promoteur représente une région d'ADN mesurant environ 100 pb où le complexe de préinitiation de la transcription (PIC) s'assemble. Le coeur du promoteur inclut le site d'initiation de la transcription, la boîte TATA se trouvant en amont du site d'initiation et les séquences initiatrices (Inr) qui chevauchent le site d'initiation. Les promoteurs peuvent comporter une boîte TATA, une séquence Inr ou les deux (Novina et Roy, 1996). Chez les eucaryotes supérieurs, la séquence TATA est localisée de 25 à 30 pb en amont du site d'initiation de la transcription et représente le site de liaison à la protéine TBP (« TATA-binding protein »). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la boîte TATA est située de 40 à 120 pb en amont du site d'initiation de la transcription (Struhl, 1995). Des analyses par mutagenèse chez cet organisme ont défini que la séquence consensus de la boîte TATA est TATAAA (Chen *et al.*, 1988; Singer *et al.*, 1990 et Wobbe et Struhl, 1990). Par contre, la protéine TBP peut lier une large gamme de séquences, rendant difficile l'identification de sites de liaison à TBP à partir d'une séquence d'ADN seule (Cormack et Struhl, 1992; Hahn *et al.*, 1989; Li et Sherman, 1991; Singer *et al.*, 1990 et Wobbe et Struhl, 1990). Certains gènes possèdent une séquence d'initiation (Inr) qui chevauche le site d'initiation de la transcription (Smale et Baltimore, 1989 et Smale *et al.*, 1998) et qui est liée par des facteurs de régulation qui peuvent faciliter le recrutement de la machinerie de transcription (Aso *et al.*, 1994; Carcamo *et al.*, 1991; Kaufmann et Smale, 1994; Roy *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 1993; Usheva et Shenk, 1994 et Verrijzer et Tjian, 1996). Le coeur du promoteur est suffisant pour l'initiation de la transcription par la machinerie de transcription basale, mais pas pour activer la transcription des gènes dont l'expression est inductible (Hampsey, 1998).

Les éléments régulateurs de la transcription sont des séquences spécifiques situées en amont du coeur du promoteur et qui contrôlent la fréquence de l'initiation de la transcription. Ces éléments incluent les séquences activatrices en amont (UAS) et les séquences répressives en amont (URS) qui servent de sites de liaison pour les activateurs et les répresseurs de la transcription respectivement. Les séquences UAS sont analogues aux amplificateurs chez les métazoaires. Par contre, les éléments UAS ne fonctionnent que si elles sont situées en amont de la boîte TATA (Guarente et Hoar, 1984 et Struhl, 1984). Une fois liés aux séquences UAS, les activateurs de la transcription facilitent l'assemblage du PIC en contactant directement les facteurs généraux de la transcription (FGTs) ou indirectement en contactant des coactivateurs de la transcription. Les séquences URS sont des sites de liaisons spécifiques pour les répresseurs qui affectent de manière négative la transcription de différentes manières, par exemple en empêchant la liaison des séquences UAS par les activateurs ou en contactant directement la machinerie de transcription (Johnson, 1995).

1.1.2 L'ARN polymérase II

Chez *S. cerevisiae*, l'ARN polymérase II est formée par 12 sous-unités encodées par les gènes *RPB1* à *RPB12* (Figure 1.1) (Woychik et Young, 1994). Six des sous-unités de l'ARN polymérase II de l'humain peuvent être remplacées fonctionnellement par leurs homologues chez la levure (McKune *et al.*, 1995), démontrant que la structure de l'ARN polymérase II est grandement conservée parmi les organismes eucaryotes. Les deux sous-unités les plus larges et formant le noyau catalytique l'ARN polymérase sont Rpb1 (~200 kDa) et Rpb2 (~150 kDa) et sont les sous-unités les plus conservées (Zhang *et al.*, 1999). De plus, les sous-unités Rpb1 et Rpb2 sont homologues aux sous-unités β' et β de l'ARN

polymérase bactérienne (Figure 1.1) (Woychik et Young, 1994). Les sous-unités Rpb1, Rpb2, Rpb3 et Rpb11 de l'ARN polymérase II ont des homologues chez l'ARN polymérase I et III. Par ailleurs, 5 sous-unités (Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 et Rpb12) sont partagées par les trois ARN polymérases. Dix sous-unités de l'ARN polymérase II chez la levure sont essentielles à la viabilité, seulement deux sous-unités, Rpb4 et Rpb9 sont dispensables. Des analyses fonctionnelles de ces sous-unités par mutagenèse ont révélé les rôles qui leur sont associés. Par exemple, les sous-unités assurent la précision de l'initiation de la transcription en définissant la sélection du site d'initiation de la transcription (Arndt *et al.*, 1989; Berroteran *et al.*, 1994; Furter-Graves *et al.*, 1990; Gadbois *et al.*, 1997; Hekmatpanah et Young, 1991; Hull *et al.* 1995 et Sun *et al.*, 1996). Également, les sous-unités de l'ARN polymérase II sont importantes pour l'élongation de la transcription (Archambault *et al.*, 1992 et Powell et Reines, 1996).

La plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II, Rpb1, possède un domaine carboxy-terminal (CTD) composé de nombreuses répétitions (26-27 chez *S. cerevisiae* et 52 chez l'humain) d'un motif conservé de sept acides aminés (YSPTSPS) dont cinq peuvent être phosphorylés. Le CTD de l'ARN polymérase est essentiel à la viabilité des cellules et est hautement conservé parmi les organismes eucaryotes (Hampsey, 1998). Il existe deux formes de l'ARN polymérase II selon l'état de phosphorylation du CTD *in vivo*. La forme de l'ARN polymérase dont le CTD est non phosphorylé est nommée IIA et seul le CTD déphosphorylé permet l'assemblage de l'ARN polymérase II et des facteurs généraux de transcription sur les promoteurs. La forme hautement phosphorylée du CTD est nommée IIO et est trouvée dans le complexe d'élongation (Dahmus, 1996). Différentes kinases peuvent catalyser la phosphorylation du CTD, par exemple l'activité kinase de TFIIF (Feaver *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1992 et Serizawa *et al.*, 1992), les kinases Cdc2 (Cisek et Corden, 1989), Ctk1 (Lee et Greenleaf, 1991), Srb10-Srb11 (Liao *et al.*, 1995) et P-TEFb (Marshall et al., 1996). Fcp1 est une phosphatase responsable de la déphosphorylation du

CTD (Chambers et Dahmus, 1994) et son activité phosphatase est régulée de manière positive par TFIIF et de manière négative par TFIIB (Chambers *et al.*, 1995). Le CTD est impliqué dans le recrutement de facteurs et d'enzymes nécessaires pour la coiffe des ARNm, la polyadénylation en 3' ainsi que l'épissage (Cho *et al.*, 1997; McCracken *et al.*, 1997a; McCracken *et al.*, 1997b; Yue *et al.*, 1997; Yurvey *et al.*, 1996 et Steinmetz, 1997).

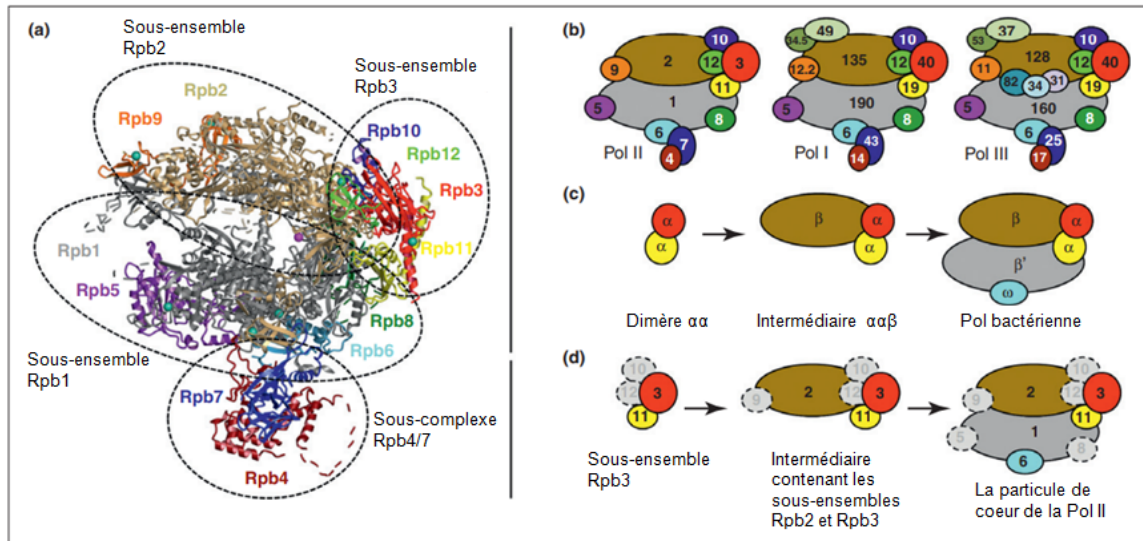


Figure 1.1 Les sous-unités et l'assemblage de l'ARN polymérase II. (a) Structure de l'ARN polymérase II déterminée par diffraction aux rayons X. (b) Représentation schématique des sous-unités des ARN polymérases eucaryotes. Les sous-unités partagées ou homologues aux trois ARN polymérases eucaryotes sont montrés dans la même couleur. (c) Assemblage de l'ARN polymérase bactérienne. L'assemblage débute par la formation d'un dimère $\alpha\alpha$, qui devient un intermédiaire $\alpha\alpha\beta$ et est complétée par l'ajout des sous-unités homologues à β' et ω . (d) Les étapes d'assemblage de la particule de cœur de la Pol II (Figure tirée et adaptée de Wild et Cramer, 2012).

1.1.3 Le complexe de préinitiation de la transcription

Les facteurs généraux de transcription (FGT) requis pour la liaison du promoteur par l'ARN polymérase II *in vitro* sont TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF et TFIIH (Conaway et Conaway, 1997; Hampsey, 1998; Orphanides *et al.*, 1996; Reinberg *et al.*, 1998 et Roeder, 1998). Des essais de fractionnements d'extraits cellulaires totaux chez la levure ont permis d'identifier cinq facteurs qui sont requis pour la transcription par l'ARN polymérase II (Sayre *et al.*, 1992) et qui sont comparables en structure et en fonctions aux FGT des mammifères. Ces facteurs ont initialement été nommés d, e, g, a et b, puis ont été renommés selon la nomenclature des mammifères, soient TBP, TFIIB, TFIIIF, TFIIE et TFIIH respectivement. Les principales caractéristiques et fonctions de quelques FGT sont décrites ci-après.

Le complexe TFIID est composé de la protéine TBP ainsi que des TAFs (facteurs associés à TBP). La protéine TBP lie l'élément TATA au niveau du promoteur, initie l'assemblage du PIC et recrute TFIIB (Eisenmann *et al.*, 1989 et Hahn *et al.*, 1989). TFIIB est composé d'une seule sous-unité de 38 kDa chez la levure et chez l'humain (Pinto *et al.*, 1992). Cette protéine permet de stabiliser l'interaction entre la protéine TBP et la boîte TATA (Goodrich *et al.*, 1993) et interagit directement avec l'ARN polymérase II et TFIIIF (Buratowski *et al.*, 1989; Ha *et al.*, 1993 et Fang et Burton, 1996). Il a été démontré que TFIIB est nécessaire pour la sélection précise du site d'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II (Pinto *et al.*, 1992 et Berroteran *et al.*, 1994). TFIIIF est composé de trois sous-unités, RAP74, RAP30 et TFG3, la dernière étant partagée entre TFIIIF, TFIID et le complexe SWI/SNF et étant non-essentielle pour la viabilité de *S. cerevisiae* (Burton *et al.*, 1988; Henry *et al.*, 1994 et Cairns *et al.*, 1996).

TFIIF joue un rôle dans la sélection du site d'initiation de la transcription (Sun et Hampsey, 1995) ainsi que dans la suppression des liaisons non spécifiques de l'ARN polymérase II sur l'ADN et dans la stabilisation du PIC (Flores *et al.*, 1988; Conaway et Conaway, 1993 et Greenblatt, 1991). Finalement, TFIIF stimule l'élongation en supprimant les pauses durant la transcription (Bengal *et al.*, 1991; Bradsher *et al.*, 1993; Flores *et al.*, 1989; Izban et Luse, 1992; Price *et al.*, 1989 et Tan *et al.*, 1994). TFIIE est composé de deux sous-unités, TFA1 et TFA2, chez l'humain et la levure (Lee et Young, 2000) et interagit avec l'ARN polymérase II non phosphorylée, TFIIF, TFIIH et plusieurs activateurs de transcription (Flores *et al.*, 1989; Maxon et Tjian, 1994; Sauer *et al.*, 1995 et Zhu et Kuziora, 1996). TFIIE recrute TFIIH au PIC et stimule l'activité CTD kinase et ATPase de TFIIH (Lu *et al.*, 1992; Ohkuma *et al.*, 1995 et Ohkuma et Roeder, 1994). On pense que TFIIE joue également des rôles dans l'ouverture ou le maintien de l'ouverture de la bulle de transcription (Kuldell et Butarowski, 1997). TFIIH possède des activités enzymatiques, incluant une ATPase dépendante de l'ADN (Conaway et Conaway, 1989 et Roy *et al.*, 1994), une hélicase dépendante de l'ATP (Schaeffer *et al.*, 1993 et Serizawa *et al.*, 1993) et une activité kinase sur le CTD de Rpb1 (Feaver *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1992 et Serizawa *et al.*, 1992). TFIIH joue plusieurs rôles dans la transcription génique, agissant dans les étapes avant, pendant et immédiatement après l'initiation de la transcription (Dvir *et al.*, 1997). En effet, l'hélicase de TFIIH est nécessaire pour l'ouverture de la bulle de transcription par l'ARN polymérase II (Guzman et Lis, 1999 et Wang *et al.*, 1992). De plus, TFIIH régule la transition entre l'initiation de la transcription et l'élongation par son activité kinase sur le CTD de Rpb1 (Feaver *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1992 et Serizawa *et al.*, 1992). En plus de son rôle dans la transcription génique, TFIIH est important dans la réparation de l'ADN par le mécanisme NER (réparation par excision de nucléotides) (Drapkin *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994 et Wang *et al.*, 1995) en interagissant avec certaines composantes du NER (Humbert *et al.*, 1994; Schaeffer *et al.*, 1994 et van Vuuren *et al.*, 1994).

In vitro, l'ARN polymérase II et les FGT s'assemblent dans un ordre précis (Van Dyke *et al.*, 1988; Buratowski *et al.*, 1989 et Maldonado *et al.*, 1990) suggérant que le PIC s'assemble de manière séquentielle. Par contre, il a été démontré que plusieurs FGT et des protéines Srb peuvent s'associer à l'ARN polymérase II en absence d'ADN, suggérant l'existence d'un complexe holoenzyme de l'ARN polymérase II (Conaway et Conaway, 1993). Chez la levure, l'holoenzyme de l'ARN polymérase II est un complexe de l'ARN polymérase II, certains FGT et le complexe Srb-Médiateur (Kim *et al.*, 1994 et Koleske et Young, 1994). L'holoenzyme ARN polymérase II purifiée peut initier la transcription et médier la réponse aux activateurs lorsque supplémentée par des facteurs généraux de transcription additionnels, telle que TBP (Koleske et Young, 1994). Dû aux différences dans les méthodes de purification de l'holoenzyme, plusieurs groupes ont purifié différentes formes d'holoenzymes (Bjorklund et Kim, 1996; Lee *et al.*, 1997 et Li *et al.*, 1995) contenant différents FGT, des coactivateurs ou des complexes de remodelage, tel que Swi/Snf. L'holoenzyme ARN polymérase II a également été identifiée dans les cellules de mammifères (Ossipow *et al.*, 1995; Chao *et al.*, 1996 et Maldonado *et al.*, 1996) et son coeur est composé de l'ARN polymérase II, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF et TFIIH. Plusieurs variantes ont été identifiées, incluant entre autres des protéines homologues aux protéines Srb chez la levure, des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, des facteurs d'épissage et de polyadénylation ainsi que BRCA1, un suppresseur de tumeur (Chao *et al.*, 1996; Maldonado *et al.*, 1996; McCracken *et al.*, 1997a; McCracken *et al.*, 1997b et Scully *et al.*, 1997).

1.2 La chromatine

La chromatine est une structure composée d'ADN, de nucléosomes et de protéines non-histones, telles les protéines HMG, servant à compacter le génome eucaryote et le confiner dans les limites du noyau. Le modèle historique de compaction de l'ADN propose trois niveaux dont le niveau le plus simple est représenté par l'enroulement de l'ADN autour des nucléosomes pour former une fibre d'environ 11 nm et est appelé « le collier de perles » (Figure 1.2). Ensuite, l'histone H1 s'associe à l'ADN internucléosomique afin de permettre aux nucléosomes de s'organiser en une fibre de 30 nm en forme de solénoïde. Finalement, le troisième niveau de compaction est formé par l'association de la fibre de chromatine de 30 nm avec des protéines non histones qui vont lui servir d'échafaudage afin de créer des boucles de chromatine (Woodcock et Dimitrov, 2001). Par contre, une équipe a récemment remis en doute l'existence de la fibre de 30 nm puisque celle-ci n'est pas visible dans les noyaux par cryotomographie électronique chez *S. cerevisiae* (Chen et al., 2016). De plus, la chromatine ne semble pas former de structure compacte en interphase ou en mitose. En se basant sur cette étude et d'autres articles récents, il est plutôt proposé que la fibre de 11 nm se rattache à un échafaudage nucléaire afin de former des boucles et créer une structure condensée.

Les niveaux de compaction du génome influencent grandement le déroulement de certains processus impliquant l'ADN, tels que la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN. La cellule possède plusieurs mécanismes capables d'altérer la structure de la chromatine de manière localisée ou globale afin de rendre l'ADN plus ou moins accessible aux machineries nucléaires.

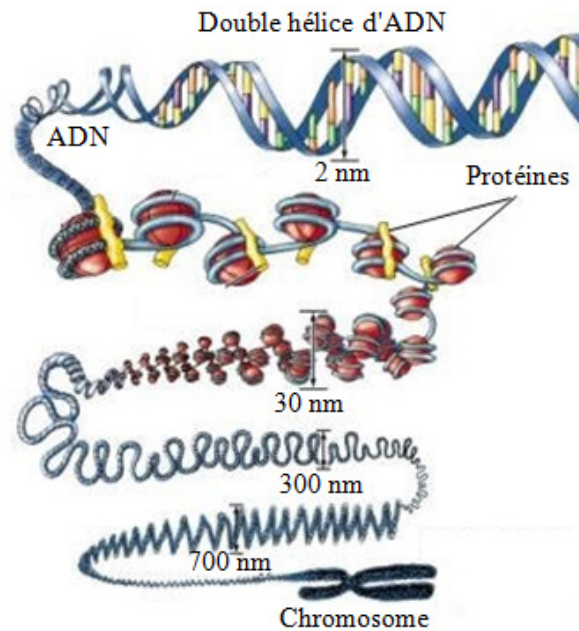


Figure 1.2 Représentation schématique des niveaux de compaction de l'ADN. La répétition des nucléosomes de manière périodique sur l'ADN représente le premier niveau de structure chromatinienne. L'empilement des nucléosomes par les histones de liaison H1 forme une structure de la chromatine en forme de solénoïde et représente le deuxième niveau de compaction. Finalement, les interactions entre les structures secondaires forment des boucles de chromatine qui représentent le troisième niveau de compaction.

1.2.1 Les histones et le nucléosome

Le génome eucaryote est organisé sous forme de chromatine dont l'unité de base est le nucléosome. Chez les métazoaires, les nucléosomes sont trouvés à la grandeur du génome de manière périodique, soit à toutes les 200 ± 40 pb (Luger *et al.*, 1997) et à environ toutes les 165 pb chez *S. cerevisiae* (Bash et Lohr, 2001). De manière simplifiée, le nucléosome est composé d'une particule de coeur et d'une région de liaison (région

internucléosomale) qui relie les particules de coeur adjacentes. La structure de la particule de coeur est très conservée à travers les espèces et est composée de 146 pb d'ADN enroulé autour d'un octamère d'histones. Il existe quatre histones canoniques, soient H2A, H2B, H3 et H4, qui sont de petites protéines chargées positivement et ayant un poids moléculaire entre 11 et 16 kDa. La longueur de la région de liaison varie selon les espèces et le type cellulaire. Il existe des histones de liaison, telles que l'histone H1, qui sont peu conservées à travers les espèces et qui lient les régions internucléosomales. Les histones de liaison jouent un rôle dans l'espacement des nucléosomes et dans la compaction de l'ADN (Kornberg et Lorch, 1999 et Zlatanova *et al.*, 1999).

Une étude par diffraction aux rayons X sur le coeur du nucléosome avec une résolution de 2.8 Å chez *Xenopus laevis* a permis de déterminer la structure complexe du coeur du nucléosome (Figure 1.3) (Luger *et al.*, 1997). Celui-ci est formé par deux copies de chacune des histones canoniques organisées sous la forme de deux dimères H2A-H2B et d'un tétramère (H3-H4)₂. L'assemblage de manière stable du nucléosome dépend de l'hétérodimérisation des histones H3-H4 et de la dimérisation subséquente de deux molécules H3 afin de former le tétramère (H3-H4)₂ (Eickbush et Moudrianakis, 1978). Le tétramère (H3-H4)₂ peut former un complexe stable avec une molécule d'ADN de 120 pb ou plus (Hayes *et al.*, 1991). Les histones H2A et H2B forment également un hétérodimère stable, mais ne s'autoassemblent pas en tétramère (Arents *et al.*, 1991). L'interaction entre les histones H4 du tétramère et les histones H2B des deux dimères permet la formation de l'octamère. L'octamère d'histone interagit avec l'ADN par des ponts hydrogène entre les groupements amides des histones et le groupement phosphate de l'ADN et des interactions hydrophobes avec le désoxyribose. Chaque hétérodimère H2A-H2B contacte approximativement 3 tours d'hélice d'ADN (environ 30 pb), tandis que le tétramère (H3-H4)₂ contacte 90 pb d'ADN (Luger *et al.*, 1997).

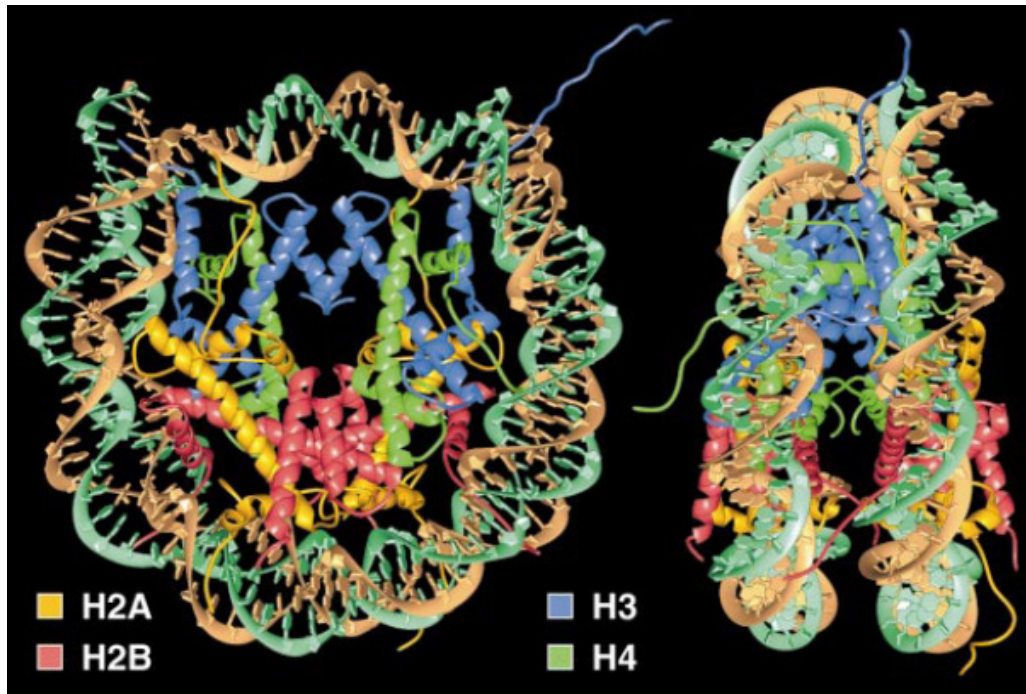


Figure 1.3 Organisation de la particule de coeur du nucléosome. La particule de coeur du nucléosome: un segment d'ADN de 146 paires de base enroulé autour de huit histones canoniques (jaune: H2A, rouge: H2B, bleu: H3 et vert: H4). Les points de vue sont du bas selon l'axe de la superhélice d'ADN pour la particule de gauche et perpendiculaire pour la particule de droite.

Chacune des histones du coeur possède une portion centrale structurée, appelée le « histone fold ». Ce motif conservé consiste en deux courtes hélices alpha de 11 acides aminés et d'une longue hélice centrale de 27 résidus séparées par des boucles et des feuillets β (Arents et Moudrianakis, 1995). Ce motif permet le repliement adéquat des histones ainsi que les interactions histones-histones qui mènent à la dimérisation des histones selon une configuration en poignée de main ou « handshake motif » (Luger *et al.*, 1997). Le motif « histone fold » permet également les interactions ADN-histones et des comparaisons par homologie ont identifié plusieurs protéines possédant un motif ressemblant au motif « histone fold », incluant les facteurs associés à TBP (TAFs) qui

sont des sous-unités du facteur général d'initiation de la transcription TFIID (Baxevanis et al., 1995). Le motif « histone fold » trouvé dans les TAFs participe également à la dimérisation de sous-unités (Xie *et al.*, 1996; Hoffmann *et al.*, 1996 et Nakatani *et al.*, 1996) et des hétérodimères entre des TAFs et des histones ont été obtenus *in vitro* (Hoffmann *et al.*, 1996).

Les extrémités des histones, aussi appelées queues N- ou C-terminales, constituent des domaines protéiques fonctionnels distincts qui s'étendent à partir du coeur du nucléosome. Les extrémités des histones sont dites flexibles puisqu'elles ne sont pas structurées et ne font pas partie du motif central « histone fold ». De plus, les extrémités des histones ne sont pas requises pour l'assemblage ou la stabilité des nucléosomes *in vitro* (Ausio *et al.*, 1989). Les queues des histones sont fortement chargées positivement puisqu'elles contiennent plusieurs arginines et lysines et sont la cible de plusieurs modifications post-traductionnelles réversibles, telles que l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitination. Les modifications sur les extrémités des histones peuvent altérer la charge, la conformation ou les interactions des histones avec l'ADN ou d'autres protéines.

1.2.1.1 Les variants d'histone

Trois des quatre histones canoniques, soient H2A, H2B et H3, se sont diversifiées au cours de l'évolution en un éventail de variants d'histones (Tableau 1.1). Ces variants

possèdent des propriétés distinctes des histones canoniques ce qui permet une diversification des états chromatinien. En effet, le remplacement des histones canoniques par des variants d'histones peut affecter la stabilité du nucléosome et créer des domaines chromatinien avec une fonction spécialisée. Ainsi, l'incorporation de variants d'histones dans la chromatine permet un niveau de complexité supplémentaire et une manière additionnelle de moduler la structure chromatinienne.

Tableau 1.1 Résumé des variants d'histone chez l'humain et des facteurs associés

Histone canonique	Variants d'histone	Chaperonnes et facteurs associés
H2A	H2A.Z	CHZ1/NAP1/SWR1/INO80
	H2A.X	FACT
	macroH2A	ATRX
	H2A.B*	N.D.
H3	CENP-A	HJURP
	H3.3	HIRA/ATRX/DAXX
	H3.4*	N.D.
H2B	H2B.1*	N.D.
	H2B.W*	N.D.

Tableau tiré et adapté de Skene et Henikoff, 2013

Seuls les variants d'histone indépendant de la réplication sont montrés. La présence de certaines chaperones et facteurs associés peut n'exister que chez des espèces non humaines.

* Variants spécifiquement impliqués dans la spermatogenèse.

Les histones canoniques sont déposées dans la chromatine de manière couplée à la réplication et sont hautement exprimées pendant la phase S du cycle cellulaire permettant leur incorporation rapide suite au passage de la fourche de réplication. Les histones canoniques sont exprimées à partir de gènes en tandem et leur expression en phase S est régulée par la présence d'une séquence de 26 pb dans la région 3' de l'ARNm qui forme

une structure en épingle à cheveux reconnue par des protéines spécifiques (Pandey *et al.*, 1990; Dominski et Marzluff, 1999 et Whitfield *et al.*, 2000). D'un autre côté, les gènes codant les variants d'histones sont retrouvés en une copie ou un nombre faible de copies et sont exprimés tout au long du cycle cellulaire de manière indépendante à la réplication (Albig et Doenecke, 1997 et Leach *et al.*, 2000). Les pré-ARNm des variants d'histones contiennent des introns qui peuvent être soumis à l'épissage alternatif et sont polyadénylés (Rasmussen *et al.*, 1999 et Marzluff *et al.*, 2002).

Les histones sont des protéines hautement basiques afin de permettre la compaction de l'ADN qui est une molécule hautement acide. Par contre, la nature basique des histones permet des interactions indésirables avec d'autres acides nucléiques ou d'autres composantes cellulaires. Dans le but d'éviter les interactions superflues, les histones sont escortées par des chaperonnes qui cachent les charges positives sur celles-ci afin de faciliter leur déplacement du cytoplasme au noyau. Différentes chaperonnes pour les différentes histones canoniques et variants d'histones ont été identifiés, mais leurs spécificités et leurs mécanismes de déposition ne sont pas encore bien compris. Ainsi, les variants d'histones sont déposés dans la chromatine à l'aide de différentes chaperonnes d'histones et peuvent interagir avec des complexes de remodelage de la chromatine (Tagami *et al.*, 2004; Heo *et al.*, 2008; Foltz *et al.*, 2009; Luk *et al.*, 2010 et Elsaesser et Allis, 2010). L'incorporation de variants d'histones dans la chromatine affecte les interactions entre les protéines dans le nucléosome, la stabilité du nucléosome ainsi que la conformation ouverte ou fermée de la chromatine. Par exemple, la présence des variants d'histones H2A.Z et H3.3 est associée à une conformation ouverte de la chromatine et un état transcriptionnel actif. D'un autre côté, l'incorporation de macroH2A stabilise le nucléosome et est principalement associée à une conformation répressive de la chromatine (Chakravarthy et Luger, 2006 et Thakar *et al.*, 2009). Les variants d'histones sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires, tels que la réparation de l'ADN, la

régulation de la transcription, le développement de l'organisme et la stabilité des centromères (révisé dans Skene et Henikoff, 2013 et Chen *et al.*, 2013). Un défaut dans la déposition des variants d'histones dans la chromatine est associé à plusieurs maladies chez l'humain (Tableau 1.2). Quelques exemples de variants d'histones, leurs fonctions ainsi que les maladies associées à leur déposition inadéquate dans la chromatine sont résumés dans les sections qui suivent.

Tableau 1.2. Résumé des liens entre les variants d'histones et leurs facteurs associés et les différentes maladies associées chez l'humain

Variant d'histone/ chaperonne	Maladie associée	Notes	Références
H2A.Z	Cancer du sein	Une surexpression facilite l'activation des gènes de réponse aux œstrogènes et est associée au stade de métastase	Rangasamy, 2010 et Svtelis et al., 2010
H2A.Z	Cancer du colon	Une expression réduite est associée avec l'instabilité génomique	Dunican et al., 2002 et Rangasamy et al., 2004
CENP-A	Cancer colorectal	Une surexpression et un mauvais ciblage sont démontrés dans plusieurs cancers et joueraient un rôle dans l'aneuploïdie	Tomonaga et al., 2003 et Li et al., 2011
HJURP	Cancer du sein	Une surexpression est associée à un mauvais pronostic et une sensibilité accrue à la radiothérapie	Hu et al., 2010
macroH2A	Mélanome malin/ cancer des poumons	Des niveaux réduits sont associés aux cancers et corréler avec une surexpression d'oncogènes et une réduction de sénescence	Sporn et al., 2009 et Kapoor et al., 2010
ATRX	Syndrome α -thalassemia, retard mental lié au chromosome X (ATRX)	Des mutations mènent à une régulation à la baisse de l'expression du gène codant l'alpha-globine	Law et al., 2010
ATRX/DAXX	Tumeur pancréatique neuroendocrine (PanNETs)	43% des PanNETs portent une mutation dans ATRX ou DAXX	Jiao et al., 2011
H3.3	Glioblastome pédiatrique	Associé aux mutations K27M ou G34R/V dans H3.3	Schwartzentruber et al., 2012 et Wu et al., 2012

Tableau tiré et adapté de Skene et Henikoff, 2013

Le mécanisme de réparation des bris d'ADN double-brin est crucial pour la conservation de l'intégrité du génome. H2A.X est un variant de l'histone canonique H2A et diffère de celle-ci par sa région C-terminale qui contient la séquence motif SQ(E/D)(I/L/Y). Ce motif est également retrouvé sur l'histone H2A régulière de *S. cerevisiae* et sur H2A.vD (H2A.Z) de *D. melanogaster* (Downs *et al.*, 2000). Chez les mammifères, la sérine 139 de ce motif est rapidement phosphorylée par les protéines kinases ATR/ATM suivant le dommage à l'ADN (Rogakou *et al.*, 1998). La phosphorylation de H2A.X produit un variant modifié nommé γ -H2A.X et les foci γ -H2A.X peuvent s'étendre sur plusieurs mégabases à partir du dommage chez les mammifères (Rogakou *et al.*, 1999). Bien que la phosphorylation de H2A.X ne soit pas essentielle pour la détection ou la réparation des bris d'ADN double-brins, les foci γ -H2A.X jouent un rôle dans la signalisation du dommage et facilite le recrutement de la machinerie de réparation des dommages à l'ADN ainsi que certains complexes remodeleurs, tels que INO80 et SWR1 (Morrison *et al.*, 2004 et van Attikum *et al.*, 2007). De plus, les souris manquant H2A.X démontrent une sensibilité augmentée aux irradiations (Celeste *et al.*, 2002). La nécessité de la réparation de l'ADN est liée à la capacité proliférative des cellules et la carcinogenèse implique une modulation de la disponibilité de H2A.X. Plusieurs drogues anti-cancer induisent la formation de foci γ -H2A.X et leur efficacité repose sur la déficience des cellules cancéreuses à réparer les dommages à l'ADN. Ainsi, la présence des foci γ -H2A.X permet d'identifier les nouveaux agents thérapeutiques selon leur capacité à induire des dommages à l'ADN.

Les centromères sont des domaines chromatinien spéciaux représentant les points d'assemblage du complexe kinétochore servant de plateforme pour l'attachement des microtubules afin de faciliter la ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire (Amor *et al.*, 2004). CENP-A, un variant de l'histone canonique H3, est

incorporé dans la plupart des régions centromériques chez les mammifères et est essentiel pour la propagation et le maintien des centromères (Yoda *et al.*, 2000). CENP-A est également retrouvée chez plusieurs autres espèces sous différents noms, par exemple Cse4 chez *S. cerevisiae* (Stoler *et al.*, 1995), SpCENP-A chez *S. pombe* (Takahashi *et al.*, 2000), HCP-3 chez *C. elegans* (Sullivan *et al.*, 2001), Cid chez la drosophile (Henikoff *et al.*, 2000) et Cenpa chez la souris (Howman *et al.*, 2000). Une chaperonne spécifique, HJURP (Holliday junction recognition protein) incorpore CENP-A aux centromères tôt dans la phase G1 de manière indépendante de la réplication chez les mammifères (Jansen *et al.*, 2007; Foltz *et al.*, 2009 et Dunleavy *et al.*, 2009). Il a été démontré que l'expression de CENP-A est élevée dans les cellules épithéliales cancéreuses ovariennes et que son niveau d'expression est corrélé avec un faible taux de survie chez les patients, suggérant que CENP-A pourrait servir de marqueur pour le pronostic du cancer ovarien et de cible potentielle pour une thérapie épigénétique (Qiu *et al.*, 2013).

1.2.2 Les modifications de la chromatine

Le cœur du nucléosome contient un octamère d'histones composé de deux copies de chacune des histones canoniques, soient H2A, H2B, H3 et H4 (Luger *et al.*, 1997). La compaction de l'ADN sous forme de chromatine est un processus dynamique puisque l'ADN doit être accessible afin de remplir certaines fonctions nucléaires clés telles que la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN. Conséquemment, plusieurs mécanismes ont évolué afin de contrôler l'empaquetage de la chromatine et ainsi moduler l'accessibilité à l'ADN (Belotserkovskaya et Berger, 1999; Krebs et Peterson, 2000 et Gregory *et al.*, 2001). Premièrement, les queues N-terminales des histones s'étendent à l'extérieur du cœur du nucléosome et contactent l'ADN, d'autres histones et des protéines

non-histones. Les queues des histones sont sujettes aux modifications post-traductionnelles qui peuvent moduler les interactions des histones avec leur environnement (Strahl et Allis, 2000 et Imhof et Becker, 2001). Deuxièmement, des complexes remodeleurs de nucléosomes peuvent altérer les interactions entre les histones et l'ADN de manière à rendre l'ADN nucléosomal accessible. Étant donné que les histones et l'ADN sont associés grâce à un large nombre d'interactions faibles, le remodelage de la chromatine requiert une entrée d'énergie qui sera fournie par des complexes remodeleurs capables d'hydrolyser l'ATP. Les différents mécanismes altérant la structure de la chromatine seront discutés dans les sections suivantes.

1.2.2.1 Les modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications post-traductionnelles des histones sont des modifications covalentes et représentent un ensemble de marqueurs de la chromatine. En plus de leur rôle structural, les extrémités des histones sont sujettes aux modifications post-traductionnelles qui peuvent affecter la dynamique de la chromatine en altérant les propriétés et les partenaires d'interaction des nucléosomes (Choi et Howe, 2009 et Strahl et Allis, 2000). Ces modifications altèrent les charges électrostatiques des histones, changent les propriétés structurales et modifient les interactions de leurs extrémités. Par exemple, certaines modifications post-traductionnelles des queues des histones sont associées à une conformation plus ou moins accessible de la chromatine, tandis que d'autres peuvent être retrouvées dans des régions hautement compactées et transcriptionnellement inactives (Turner, 1993 et Strahl et Allis, 2000). Les modifications post-traductionnelles des histones les plus étudiées sont l'acétylation, la phosphorylation, la méthylation et l'ubiquitination (Figure 1.2) et ces modifications covalentes sont réversibles. Dans la

plupart des cas, les sites de modifications précis ont été identifiés. On pense que la combinaison de modifications post-traductionnelles lues par des domaines protéines spécifiques agirait comme un code afin d'induire différentes réponses à des endroits précis du génome et moduler certains processus, tels que la mitose, la transcription ou la réplication (Strahl et Allis, 2000).

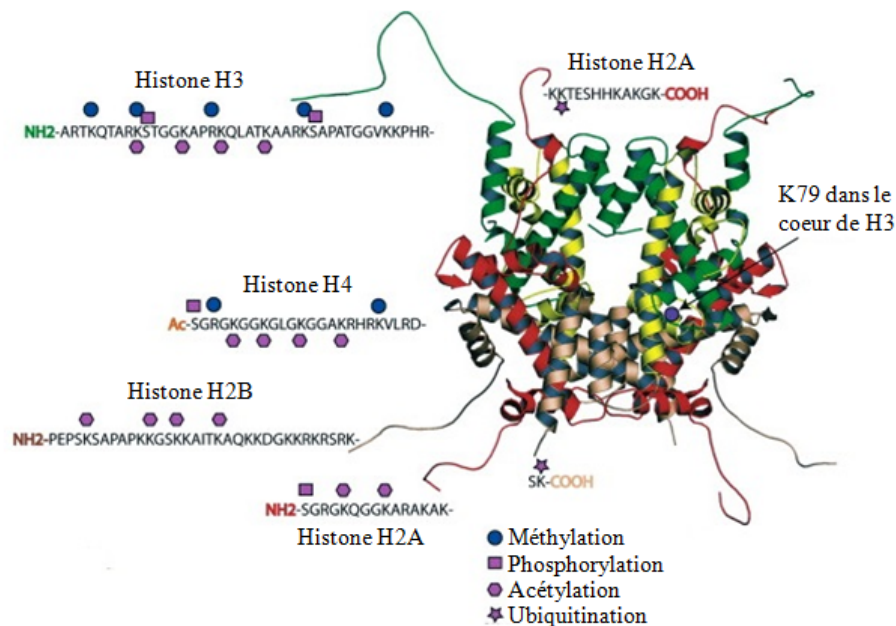


Figure 1.4 Les modifications post-traductionnelles des histones. Ce modèle représente les types de modifications post-traductionnelles (méthylation, phosphorylation, acétylation et ubiquitination) observées sur l'octamère d'histones d'un nucléosome. Les modifications sont représentées pour chacune des histones (H3 en vert, H4 en jaune, H2A en rouge et H2B en rose) (Figure tirée et adaptée de Khorasanizadeh, 2004).

L'acétylation des histones est la modification covalente la plus étudiée et la mieux comprise quant aux résidus affectés et les conséquences d'une telle modification sur la transcription. Chacune des histones canoniques possède plusieurs lysines sur leur queue

N-terminale pouvant être acétylé de manière réversible. Les différentes études suggèrent un lien positif entre l'acétylation des queues des histones et l'activité transcriptionnelle. En effet, les histones hyperacétylées sont associées aux domaines transcriptionnellement actifs et à une conformation ouverte de la chromatine. D'un autre côté, les histones hypoacétylées sont enrichies dans les régions où la transcription est réprimée (Hebbes *et al.*, 1994; Hebbes *et al.*, 1988; Walker *et al.*, 1990 et Zhang et Nelson, 1988). Il est proposé que l'acétylation des histones altère la structure de la chromatine en neutralisant les charges des lysines diminuant ainsi leur affinité pour l'ADN ou les nucléosomes voisins (Grunstein, 1997 et Luger et Richmond, 1998). De plus, l'acétylation des histones peut être reconnue par des protéines possédant un motif bromodomaine (Dhalluin *et al.*, 1999). C'est le cas de la sous-unité Snf2 du complexe remodeleur Swi/Snf qui possède un bromodomaine nécessaire à la liaison du complexe sur une matrice d'ADN nucléosomal (Hassan *et al.*, 2002). Chacune des huit histones du nucléosome peut être acétylée à de multiples positions et la combinaison de ces modifications permet d'altérer de manière dramatique la charge du nucléosome. L'acétylation peut, selon les différents états de distribution de charge du nucléosome, influencer la transcription en promouvant ou réprimant les interactions avec des facteurs de transcription spécifiques (Davie et Spencer, 1999; Workman et Kingston, 1998 et Workman et Langmore, 1985). Les enzymes capables de transférer un groupement acétyl provenant de l'acétyl coenzyme A sur le groupe ϵ -aminé d'une lysine de l'histone (Roth *et al.*, 2001) sont nommées des histones acétyltransférases (HAT). De multiples HAT ont été identifiées chez plusieurs espèces ainsi que dans un même organisme et sont divisées en familles selon leurs homologies (Table 1.3). Il existe deux types de HAT, soient les enzymes cytoplasmiques HAT-B qui acétylent les histones nouvellement synthétisées, et les enzymes nucléaires HAT-A (Lee et Young, 2000; Roth *et al.*, 2001 et Workman et Kingston, 1998). Les enzymes qui catalysent la réaction inverse aux HAT, soit d'enlever le groupement acétyl sur les lysines, se nomment les complexes histones déacétylases (HDAC) (Table 1.4).

Tableau 1.3 Les différentes classes d'histones acétyltransférases (HATs)

Famille	Organisme	Complexes associés	Spécificité du substrat	Caractéristiques structurelles
GNAT				
Gcn5	<i>S. cerevisiae</i>	SAGA, SLIK (SALSA), ADA, HAT-A2	H2B, H3, (H4)	Bromodomaine
GCN5	<i>D. melanogaster</i>	SAGA, ATAC	H3, H4	Bromodomaine
GCN5	<i>H. sapiens</i>	STAGA, TFTC	H3, (H4, H2B)	Bromodomaine
PCAF	<i>H. sapiens</i>	PCAF	H3, H4	Bromodomaine
Hat1	<i>S. cerevisiae</i> - <i>H. sapiens</i>	HAT-B, NuB4, HAT-A3	H4, (H2A)	
Elp3	<i>S. cerevisiae</i>	Élongateur	H3, H4, (H2A, H2B)	
Hpa2	<i>S. cerevisiae</i>	HAT-B	H3, H4	
Hpa3	<i>S. cerevisiae</i>		H3, H4	
ATF-2	<i>S. cerevisiae</i> - <i>H. sapiens</i>		H2B, H4	
Nut1	<i>S. cerevisiae</i>	Médiateur	H3, H4	
MYST				
Esa1	<i>S. cerevisiae</i>	NuA4, piccolo	H2A, H4, (H2B, H3)	Chromodomaine
Sas2	<i>S. cerevisiae</i>	SAS, NuA4	H4, (H2A, H3)	
Sas3 (Ybf2)	<i>S. cerevisiae</i>	NuA3	H3, (H4, H2A)	
Tip60	<i>H. sapiens</i>	Tip60, NuA4	H2A, H4, (H3)	Chromodomaine
MOF	<i>D. melanogaster</i>	MSL	H4, (H2A, H3)	Chromodomaine
MOZ	<i>H. sapiens</i>	MSL	H3, H4	
MORF	<i>H. sapiens</i>	MSL	H3, H4	
HBO1	<i>H. sapiens</i>	ORC	H3, H4	
P300/CBP				
P300	<i>H. sapiens</i>		H2A, H2B, H3, H4	Bromodomaine
CBP	<i>H. sapiens</i>		H2A, H2B, H3, H4	Bromodomaine
SRC (récepteurs nucléaires coactivateurs)				
SRC-1	<i>H. sapiens</i>	ACTR/SRC-1	H3, H4	
ACTR (RAC3, AIB1, TRAM-1)	<i>H. sapiens</i>	ACTR/SRC-1	H3, H4	
TIF-2 (GRIP1)	<i>H. sapiens</i>		H3, H4	
SRC-3	<i>H. sapiens</i>			
Autres				
TAF _{II} 250 (TAF1)	<i>S. cerevisiae</i> - <i>H. sapiens</i>	TFIID	H3, H4, (H2A)	Bromodomaine
TFIIIC (p220, p110, p90)	<i>H. sapiens</i>	TFIIIC	H2A, H3, H4	
Rtt109	<i>S. cerevisiae</i>	Chaperonnes d'histones	H3	
CLOCK	<i>H. sapiens</i>		H3, H4	

Tableau 1.4 Les différentes classes d'histones déacétyltransférases (HDACs)

Classe	Membre	Sites catalytique	Localisation cellulaire	Distribution tissulaire	Substrats	Partenaires d'interaction
I	HDAC1	1	Noyau	Ubiquitaire	Récepteurs d'androgènes, SHP, p53, MyoD, E2F1, STAT3	-
	HDAC2	1	Noyau	Ubiquitaire	Récepteurs de glucocorticoïde, YY1, BCL6, STAT3	-
	HDAC3	1	Noyau	Ubiquitaire	SHP, YY1, GATA1, RELA, STAT3, MEF2D	-
	HDAC8	1	Noyau/cytoplasme	Ubiquitaire?	-	EST1B
IIA	HDAC4	1	Noyau/cytoplasme	Coeur, squelette, muscle, cerveau	GCMA, GATA1, HP1	RFXANK
	HDAC5	1	Noyau/cytoplasme	Coeur, squelette, muscle, cerveau	GCMA, GATA1, HP1	REA, récepteur aux oestrogènes
	HDAC7	1	Noyau/cytoplasme/ mitochondrie	Coeur, squelette, muscle, pancréas, placenta	PLAG1, PLAG2	HIF1A, BCL6. récepteur de l'endothéline, ACTN1, ACTN4, récepteur aux androgènes, Tip60
	HDAC9	1	Noyau/cytoplasme	Cerveau, squelette, muscle	-	FOXP3
IIB	HDAC6	2	Majoritairement cytoplasme	Coeur, foie, reins, placenta	A-Tubuline. HSP90, SHP, SMAD7	RUNX2
	HDAC10	1	Majoritairement cytoplasme	Foie, rate, reins	-	-
III	Sirtuines chez les mammifères (SIRT1 à SIRT7)	-	-	-	-	-
	Sir2 chez <i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-
IV	HDAC11	2	Noyau/cytoplasme	Cerveau, coeur, squelette, muscle, reins	-	-

Les principales HDAC sont séparées en classes selon leur profil d'expression, leur homologie et leur sensibilité aux inhibiteurs. De manière générale, la déacétylation des histones joue un rôle négatif dans le contrôle de la transcription. Les HDAC

appartiennent fréquemment à des complexes multiprotéiques et certains répresseurs transcriptionnels sont associés à des HDAC afin de réprimer certains gènes (Peterson, 2002 et Vaquero et al, 2003). Les complexes HAT et HDAC peuvent être recrutés par des facteurs de transcription et ciblés aux promoteurs pour agir comme des co-activateurs ou co-répresseurs de la transcription. Par exemple, Hda1 déacétyle les histones H2B et H3 lorsqu'elle est ciblée au promoteur par le répresseur Tup1 (Wu *et al.*, 2001). On suppose que les histones déacétylées interagissent plus fortement avec l'ADN que les histones acétylées, ce qui maintiendrait un état condensé de la chromatine.

Les queues des histones peuvent être phosphorylées sur les résidus sérines. L'acétylation et la phosphorylation altèrent la distribution des charges des histones: alors que l'acétylation neutralise les charges positives des résidus lysines, la phosphorylation introduit une charge négative. L'ajout de groupements phosphates aux histones pourrait donc également affaiblir les interactions entre l'ADN et les histones. Cette modification joue un rôle dans plusieurs processus cellulaires, tels que la condensation des chromosomes, la transcription, la réparation de l'ADN et l'apoptose (Cheung *et al.*, 2000a). Entre autres, suite aux dommages à l'ADN, les histones H2A chez la levure et H2A.X chez les mammifères sont phosphorylées sur la sérine du motif SQ(E/D)(I/L/Y) dans la région C-terminale. Cette modification s'étend sur plusieurs mégabases autour du dommage (Rogakou *et al.*, 1998 et Rogakou *et al.*, 1999) et permettrait le recrutement et la stabilisation de facteurs de réparation (Celeste *et al.*, 2003 et Paull *et al.*, 2000). Aussi, l'histone de liaison H1 peut être phosphorylée sur le domaine [S/TP-X-K/R] et cette modification réduit l'interaction entre les queues des histones et l'ADN, ce qui déstabilise les nucléosomes. La phosphorylation de H1 influence l'activation et la répression de la transcription et joue également des rôles dans la condensation des chromosomes et la réplication de l'ADN (Guo et al., 2000 et Mizzen *et al.*, 1999). Plusieurs protéines kinases sont responsables de la phosphorylation des histones et sont impliquées dans différents

processus. Par exemple, plusieurs kinases phosphorylent l'histone H3, incluant la kinase Rsk-2 impliquée dans l'activation de la transcription (De Cesare *et al.*, 1998 et Sassone-Corsi *et al.*, 1999), la kinase Msk1 activée par un facteur de croissance (Thomson *et al.*, 1999) et la kinase Jil-1 impliquée dans la compensation de dosage chez *D. melanogaster* (Jin *et al.*, 1999). La phosphorylation de H3 sur la sérine 10 en N-terminal joue un rôle dans la transcription et la condensation des chromosomes (Cheung *et al.*, 2000a; Cheung *et al.*, 2000b; Houben *et al.*, 1999 et Lo *et al.*, 2001). La phosphorylation est une modification réversible puisqu'il existe des enzymes phosphatases capables d'enlever le groupement phosphate.

Les histones peuvent être méthylées sur les résidus arginines et lysines. Plus précisément, les résidus lysines peuvent être mono, di ou triméthylées, alors que les arginines peuvent être mono ou diméthylées (Kouzarides, 2002 et Strahl et Allis, 2000). Les histones H3 et H4 peuvent être méthylées sur les lysines (Turner, 2002). Les enzymes capables de transférer un groupement méthyl à partir de méthionine S-adenosyl sur un groupement ε amino-terminal de résidu arginine ou lysine des histones sont nommées des histones méthyltransférases (HMT). La méthylation des histones joue un rôle dans l'activation et la répression de la transcription puisque cette modification permet le recrutement de facteurs de la transcription possédant un domaine X au promoteur. Par exemple, lorsque l'enzyme HMT SUV39 est recrutée au promoteur cycline E par le répresseur Rb, celle-ci méthyle la lysine 9 de l'histone H3 et crée une surface d'interaction pour la protéine HP1 qui réprime l'expression du gène (Bannister *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001 et Nielsen *et al.*, 2001). L'enzyme Set2 méthyle la lysine 36 de l'histone H3 chez la levure (Briggs *et al.*, 2002 et Xiao *et al.*, 2003) et s'associe avec la forme phosphorylée de l'ARN pol II (Li *et al.*, 2002 et Xiao *et al.*, 2003) suggérant que la méthylation de ce résidu joue un rôle dans l'élongation de la transcription. La méthylation des arginines est une modification

moins bien connue, mais il a été démontré que la méthylation de l'arginine 17 de l'histone H3 est présente seulement dans les promoteurs actifs (Bauer *et al.*, 2002).

Les histones, principalement H2A, mais également H2B et H3, peuvent être ubiquitinées de manière réversible sur les lysines dans la région C-terminale. Fréquemment, l'ajout de l'ubiquitine (76 acides aminés) sur une protéine cible la protéine modifiée vers le protéasome pour sa dégradation. Dans le cas des histones, l'ubiquitination ne mène pas à la dégradation, mais affecte divers processus. L'ubiquitination des histones joue un rôle dans les processus de mitose et méiose (Berger, 2002) et aurait un rôle en transcription puisqu'elle est redondante fonctionnellement avec les complexes de remodelage SAGA et Swi/Snf (White *et al.*, 2001).

1.2.2.2 Les complexes de remodelage ATP-dépendants

La structure de la chromatine peut être altérée par l'action des complexes remodeleurs qui utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP afin de remodeler les nucléosomes. Certains complexes permettent de glisser les nucléosomes le long de l'ADN, transférer des nucléosomes, évincer ou incorporer des histones des nucléosomes. Le remodelage implique une rupture et une reconstruction des contacts entre les histones et l'ADN qui confère une certaine mobilité aux nucléosomes. Ces réactions biochimiques conduisent au mouvement de l'octamère d'histones et à son positionnement sur les éléments régulateurs de l'ADN. Par exemple, le remodelage de la chromatine peut mener à la

relocalisation des octamères d'histones à une séquence d'ADN acceptrice en *cis* ou en *trans*, conservant ainsi le niveau d'empaquetage de l'ADN en général, mais exposant transitoirement certaines régions d'ADN aux protéines interactrices (Kingston et Narlikar, 1999). Les complexes de remodelage sont impliqués dans plusieurs processus tels que la régulation positive et négative de la transcription, la réparation de l'ADN, la recombinaison homologe et la progression du cycle cellulaire (Becker et Horz, 2002; Tsukiyama, 2002 et Lusser et Kadonaga, 2003).

Des facteurs de remodelage de la chromatine sont présents chez tous les eucaryotes. Tous les facteurs identifiés sont des complexes multiprotéiques et contiennent de 2 à 12 sous-unités et une sous-unité catalytique appartenant à la famille Snf2 des ATPases (Eisen *et al.*, 1995). La famille Snf2 appartient à la superfamille DEAD/H des ATPases stimulées par des acides nucléiques (Eisen *et al.*, 1995). Quatre familles distinctes de complexes de remodelage ATP-dépendants sont décrites selon les sous-unités catalytiques: Swi/Snf, ISWI, CHD/MI-2 et INO80 (Figure 1.3). Les complexes remodeleurs de la chromatine possèdent un domaine ATPase essentielle pour leur activité de remodelage, mais également des sous-unités qui affectent la régulation, l'efficacité et la spécificité.

Les membres de la famille Swi/Snf sont présents de la levure à l'humain (Eberharder et Becker, 2004). Ils régulent l'expression des gènes en altérant la structure de la chromatine par glissement des nucléosomes sur l'ADN ou par transfert d'un octamère (Martens et Winston, 2003 et Sudarsanam et Winston, 2000). La famille Swi/Snf est caractérisée par des ATPases de type Snf2 (Swi2/Snf2) et contiennent un bromodomaine liant les extrémités acétylées des histones H3 et H4 (Hassan *et al.*, 2002).

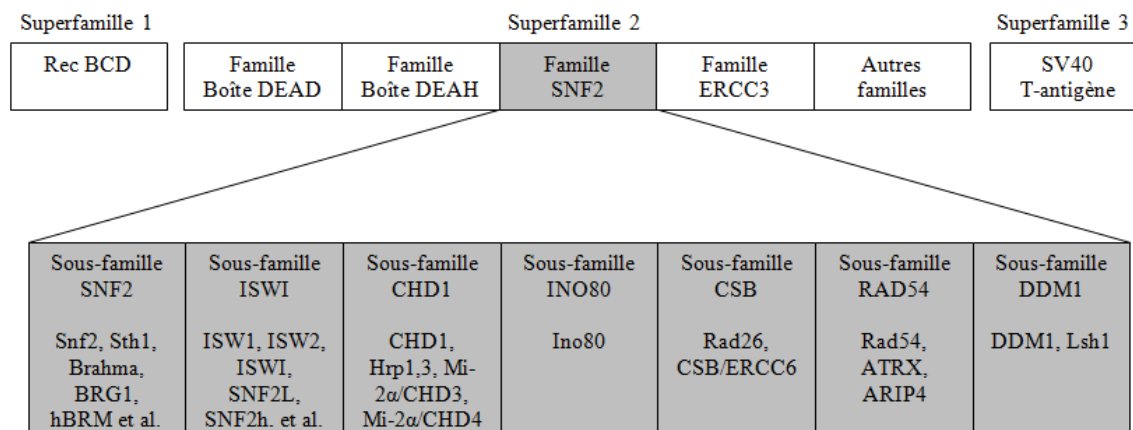


Figure 1.5 La famille d'ATPases Snf2. Cette famille inclut des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. Le diagramme montre la classification des ATPases selon trois différentes superfamilles. La superfamille 2 est divisée en sous-familles distinctes (Figure tirée et adaptée de Lusser et Kadonaga, 2003).

La famille Swi/Snf chez *S. cerevisiae* rassemble les complexes Swi/Snf, RSC et INO80 dont les sous-unités catalytiques sont Swi2/Snf2, Sth1 et Ino80 respectivement. Le complexe Swi/Snf est le premier complexe ATP-dépendant identifié chez *S. cerevisiae* (Peterson et Tamkun, 1995), il contient 11 sous-unités chez la levure (Côté *et al.*, 1994; Cairns *et al.*, 1994 et Peterson *et al.*, 1994) et son homologue chez l'humain en possède 8 (Kwon *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996a et Wang *et al.*, 1996b). Sa sous-unité catalytique, Snf2/Swi2, possède un domaine ATPase et un bromodomaine dans sa région C-terminale (Havas *et al.*, 2001). Le complexe Swi/Snf peut être ciblé aux promoteurs par son interaction avec des facteurs de transcription (Neely *et al.*, 1999; Neely et Workman, 2002 et Yudkovsky *et al.*, 1999) ou par son association avec l'holoenzyme ARN pol II (Wilson *et al.*, 1996). Par exemple au locus *RNR3*, le remodelage de la chromatine par le complexe Swi/Snf nécessite la présence de certains TAFs et la machinerie de transcription (Sharma *et al.*, 2003). Il a été démontré que plusieurs gènes exprimés pendant la phase G2/M du cycle cellulaire sont dépendants du complexe Swi/Snf (Krebs *et al.*, 2000), suggérant que ce complexe est impliqué dans l'expression de gènes

spécifiques. De plus, la délétion de Snf2/Swi2 n'affecte qu'environ 6% des gènes, et ce, autant de manières positives que négatives (Côté *et al.*, 1994; Holstege *et al.*, 1998 et Sudarsanam *et al.*, 2000).

Les membres de cette famille contiennent l'ATPase ISWI (Imitation Switch) (Elfring *et al.*, 1994), caractérisée par la présence de deux domaines carboxy-terminaux SANT qui interagissent avec les nucléosomes et l'ADN nucléosomal (Aasland *et al.*, 1996; Boyer *et al.*, 2002 et Grune *et al.*, 2003). Des expériences menées chez la Drosophile ont permis la découverte de trois complexes de remodelage contenant ISWI: NURF (Nucleosome remodeling factor), ACF (ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor) et CHRAC (Chromatin accessibility complex) (Ito *et al.*, 1997; Tsukiyama *et al.*, 1995 et Varga-Weisz *et al.*, 1997). Des homologues ont ensuite été identifiés chez différentes espèces. Deux membres de la famille ISWI sont retrouvés chez la levure, soit les complexes ISWI1 et ISWI2. Le complexe ISWI1 de la levure est homologue au complexe RSF chez l'humain et au complexe NURF chez la drosophile. La sous-unité catalytique du complexe NURF, NURF301, agit comme organisateur entre les sous-unités et est nécessaire pour l'efficacité de glissement des nucléosomes (Xiao *et al.*, 2001). Cette sous-unité interagit avec des facteurs de transcription spécifiques à des séquences d'ADN, suggérant que le complexe NURF est ciblé sur des gènes précis. In vivo, le complexe NURF est requis pour l'activation transcriptionnelle de plusieurs gènes (Badenhorst *et al.*, 2002 et Mizuguchi *et al.*, 1997). Le complexe ISWI2 de la levure est homologue au complexe hACF chez l'humain et au complexe ACF chez la drosophile. Le complexe ACF est composé de deux sous-unités, l'ATPase ISWI et Acfl (Ito *et al.*, 1999), et est requis pour l'assemblage l'espacement régulier des nucléosomes et est impliqué dans l'activation de la transcription *in vitro* (Ito *et al.*, 1997). In vivo, le complexe ACF est important pour la formation de la chromatine (Fyodorov *et al.*, 2004). Le complexe CHRAC chez la drosophile et son homologue huCHRAC chez l'humain, ne

possèdent pas d'homologue chez la levure. Tout comme le complexe ACF, CHRAC est composé des sous-unités ISWI et Acf1 (Eberharter *et al.*, 2001), mais contient deux autres sous-unités, CHRAC-14 et CHRAC-16 (Corona *et al.*, 2000). Le complexe CHRAC augmente l'accessibilité de l'ADN dans la chromatine de manière similaire au complexe ACF (Varga-Weisz *et al.*, 1997), et les deux sous-unités supplémentaires augmentent le glissement et l'assemblage des nucléosomes (Kukimoto *et al.*, 2004). Les membres de la famille ISWI possèdent des activités d'espacement des nucléosomes et jouent un rôle dans la régulation de la transcription, l'organisation du chromosome, la réplication de l'ADN (Corona et Tamkun, 2004 et Tsukiyama, 2002) ainsi que le développement et la viabilité chez la drosophile (Deuring *et al.*, 2000).

Les complexes de remodelage de la famille CHD/MI-2 possèdent des chromodomaines dans leur sous-unité ATPase (Paro et Hogness, 1991). Ces chromodomaines permettent l'interaction des complexes de remodelage avec des lysines méthylées sur plusieurs cibles variées (Brehm *et al.*, 2004). Cette famille contient seulement un membre chez la levure, nommé Chdl, également identifié chez plusieurs organismes. Chez la levure, ce complexe de 340 kDa est peu abondant (100 copies/cellule) (Tran *et al.*, 2000) et est impliqué dans la terminaison de la transcription (Alen *et al.*, 2002). Chez plusieurs espèces, Chd1 possède une activité de liaison à l'ADN et pourrait avoir un rôle dans l'activation transcriptionnelle (Kelley *et al.*, 1999). Chez la Drosophile, le complexe Chd1 est localisé aux sites génomiques hautement actifs transcriptionnellement (Stokes *et al.*, 1996).

Le complexe INO80 a initialement été découvert chez *S. cerevisiae* comme un gène requis pour l'activation transcriptionnelle du gène *INO1*. Ce complexe contient une sous-unité ATPase, Ino80, ainsi que 12 autres sous-unités dont deux protéines liées à l'hélicase

bactérienne RuvB, de l'actine et trois protéines liées à l'actine (Shen *et al.*, 2000). Le complexe INO80 possède deux activités: une activité de remodelage de la chromatine de manière dépendante de l'ATP et une activité d'hélicase attribuable à ses sous-unités Rvb1 et Rvb2. Puisque le mutant de l'ATPase Ino80 montre un défaut de transcription et une sensibilité aux agents génotoxiques, on pense que le complexe INO80 stimule la transcription et participe à la réparation de l'ADN (Shen *et al.*, 2000).

1.3 Le variant d'histone H2A.Z

H2A.Z, un variant de l'histone canonique H2A, a été identifié en 1996 par homologie de séquence avec son homologue chez le protozoaire *Tetrahymena thermophila* (Jackson *et al.*, 1996). H2A.Z est le variant le plus conservé à travers les organismes eucaryotes. On retrouve ce variant d'histone chez l'humain (Hatch et Bonner, 1988), la souris (Faast *et al.*, 2001), le poulet (Harvey *et al.*, 1983), *Xenopus leavis* (Iouzalén *et al.*, 1996), *Drosophila* (van Daal *et al.*, 1988), *Arabidopsis* (Callard et Mazzolini, 1997) et *Schizosaccharomyces pombe* (Carr *et al.*, 1994). La portion centrale de H2A.Z est très conservée, mais ses extrémités N- et C-terminales divergent significativement de l'histone H2A. Le domaine d'amarrage en C-terminal de H2A.Z présente une extension de résidus acides qui continue sur l'histone H2B dans le nucléosome. On suppose que cette surface acide représente une plateforme d'interaction et de recrutement pour des partenaires d'interaction avec les nucléosomes contenant H2A.Z (Suto *et al.*, 2000). L'incorporation de H2A.Z dans la chromatine permettrait de créer des domaines chromatiniens spécialisés possédant une fonction unique. Il a été démontré chez la Drosophile que H2A.Z est requise pour son développement et que la région C-terminale est essentielle sa la survie (Clarkson *et al.*, 1999). Depuis, plusieurs groupes ont étudié le rôle et la nécessité de la

région C-terminale de H2A.Z dans sa fonction unique par rapport à H2A. Des études de localisation à l'échelle du génome révèlent que H2A.Z est préférentiellement localisé aux promoteurs et aux régions régulatrices chez la levure et les mammifères (Zhang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Raisner *et al.*, 2005; Guillemette *et al.*, 2005; Barski *et al.*, 2007; Mavrich *et al.*, 2008; Albert *et al.*, 2007). De plus, plusieurs groupes ont démontré que H2A.Z joue un rôle dans la régulation positive et négative de la transcription chez *S. cerevisiae* (Dhillon et Kamakaka, 2000; Santisteban *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 2001; Meneghini *et al.*, 2003). Bien que l'implication de la région C-terminale de H2A.Z est intensément étudiée dans les dernières années, son rôle fonctionnel dans sa localisation génomique et dans le contrôle de la transcription génique n'est pas encore bien compris.

Les sections qui suivent introduisent la biologie de H2A.Z et les différences structurelles entre le variant et l'histone canonique H2A qui pourraient expliquer leurs différences fonctionnelles. De plus, le mode d'incorporation de H2A.Z dans la chromatine par le complexe spécifique SWR1 ainsi que sa localisation génomique sont décrits. Les travaux ayant porté sur H2A.Z en ce qui concerne son implication dans la régulation de la transcription par rapport à sa localisation, mais aussi par rapport au recrutement de protéines nucléaires sont résumés. Finalement, bien que le rôle de la région C-terminale de H2A.Z ne soit pas établi, les sections qui suivent résument les évidences de l'implication du domaine d'amarrage de H2A.Z dans sa localisation et dans le contrôle de la transcription connues à ce jour.

1.3.1 Biologie et fonctions du variant d'histone H2A.Z

Le variant d'histone H2A.Z remplace l'histone canonique H2A dans 5 à 10% des nucléosomes chez *Drosophila melanogaster*, dans 5% des nucléosomes chez la levure et dans 10% des nucléosomes chez les mammifères (Leach *et al.*, 2000; Redon *et al.*, 2002 et Zhang *et al.*, 2005). H2A.Z a divergé de l'histone canonique H2A au début de l'histoire des eucaryotes et a évolué séparément de H2A et des autres variants. Alors que les histones canoniques H3 et H4 sont les plus conservées des histones canoniques au cours de l'évolution, le variant d'histone H2A.Z est, quant à lui, le variant le plus conservé chez divers organismes eucaryotes. En effet, ce variant est retrouvé dans des organismes allant de la levure *Saccharomyces cerevisiae* aux mammifères (Thatcher et Gorovsky, 1994 et Leach *et al.*, 2000) et cette conservation suggère que ce variant possède un rôle fonctionnel important. De manière cohérente, H2A.Z est essentiel pour le développement et la survie de plusieurs organismes dont *Drosophila melanogaster* (van Daal et Elgin, 1992; Clarkson *et al.*, 1999), *Tetrahymena thermophila* (Liu *et al.*, 1996), *Xenopus laevis* (Ridgway *et al.*, 2004), *Mus musculus* et *Homo sapiens* (Faast *et al.*, 2001) puisque la délétion de H2A.Z résulte en un arrêt développemental prématuré ou la mort de l'organisme. Chez la levure unicellulaire *Saccharomyces cerevisiae*, H2A.Z est codé par le gène *HTZI* et est non essentiel pour la viabilité, mais une délétion du gène codant ce variant cause un ralentissement de croissance et une sensibilité aux agents environnementaux (Redon *et al.*, 2002).

Plusieurs études ont démontré que H2A.Z possèdent des fonctions différentes de H2A (Clarkson *et al.*, 1999; Jackson et Gorovsky, 2000 et Ridgway *et al.*, 2004). H2A.Z joue plusieurs rôles chez les différentes espèces, entre autres dans la régulation de l'expression

des gènes, dans la maintenance des frontières hétérochromatique-euchromatique, dans la réparation des dommages à l'ADN, dans la ségrégation des chromosomes, dans la résistance aux stress génotoxiques et dans la progression du cycle cellulaire (Zlatanova et Thakar, 2008) (Tableau 1.5). La séquence de H2A.Z est conservée à 90% chez les organismes eucaryotes, mais ses fonctions semblent avoir évolué différemment chez les différents organismes (Iouzalén *et al.*, 1996). Par exemple, selon l'organisme et le contexte, H2A.Z est impliqué autant dans la régulation de l'établissement de l'hétérochromatine et de l'euchromatine, régulant par le fait même les régions ouvertes ou fermées à la transcription. Un lien a rapidement été établi entre H2A.Z et l'oncogenèse puisque H2A.Z est impliqué dans la régulation de la transcription et la maintenance de la stabilité génomique. En effet, dans la recherche sur le cancer du sein, il a été démontré qu'une surexpression de H2A.Z facilite l'activation de la voie de réponse aux oestrogènes et est associée au stade métastatique (Rangasamy *et al.*, 2010 et Svtelis *et al.*, 2010). D'un autre côté, une expression réduite de H2A.Z dans le cancer du colon est associée à l'instabilité génomique (Dunican *et al.*, 2002).

Tableau 1.5 Les différentes fonctions biologiques de H2A.Z spécifiques aux diverses espèces

Espèces	Nom du variant H2A.Z	Fonctions biologiques
<i>S. cerevisiae</i>	Htz1p	<ul style="list-style-type: none"> – Activation et répression de la transcription (Santisteban et al., 2000 et Meneghini et al., 2003); – Maintenance des frontières hétérochromatique-euchromatiques (Meneghini et al., 2003 et Zhang et al., 2004); – Stabilité génomique et réparation des dommages à l'ADN (Krogan et al., 2004 et Mizuguchi et al., 2004).
<i>Trypanosoma</i>	H2A.Z	<ul style="list-style-type: none"> – Gène essentiel; – Dimérise avec un variant de H2B (H2BV); – Absent des sites de transcription active (Lowell et al., 2005).
<i>Tetrahymena thermophila</i>	Hv1	<ul style="list-style-type: none"> – Gène essentiel; – Son niveau est corrélé en temps et dans l'espace avec le niveau de transcription (Allis et al., 1980 et Stargell et al., 1993).
<i>Arabidopsis thaliana</i>	4 variants de H2A.Z : HTA4, -8, -9 et -11	<ul style="list-style-type: none"> – Absent des répétitions centromériques et péricentromériques; – Présent dans les chromosomes mitotiques (Deal et al., 2007).
<i>C. elegans</i>	Htz-1/H2A.Z	<ul style="list-style-type: none"> – Impliqué dans le développement; – Recruté aux promoteurs au commencement de la transcription (Updike et Mango, 2006).
<i>Drosophila melanogaster</i>	H2AvD	<ul style="list-style-type: none"> – Essentiel pour le développement; – Distribution génomique non aléatoire et absent des régions hautement transcrites (l'activation transcriptionnelle diminue sa présence) (Leach et al., 2000); – Requis pour la formation d'hétérochromatine (Swaminathan et al., 2005).
<i>Xenopus leavis</i>	H2A.Z	<ul style="list-style-type: none"> – Essentiel lors du développement précoce (Iouzalén et al., 1996 et Ridgway et al., 2004).
Souris	H2A _{fz} ; H2A _{fv}	<ul style="list-style-type: none"> – Essentiel lors du développement précoce (Faast et al., 2001); – Ciblé à l'hétérochromatine péricentromérique (Rangasamy et al., 2003,2004); – Rôle dans la spermatogenèse (Greaves et al., 2006); – Contribue, avec CENP-A et H3K4me2, à la structure des centromères (Greaves et al., 2007).
Humain	H2A.Z; H2AF/Z	<ul style="list-style-type: none"> – Enrichi dans les régions promotrices et son niveau de liaison corrèle avec l'expression génique; – Enrichi dans les éléments isolateurs (Barski et al., 2007); – Une fraction est associée avec le silençage génique et l'hétérochromatine facultative (Sarcinella et al., 2007).

Tableau tiré et adapté de Zlatanova et Thakar, 2008

1.3.1.1 Structure des nucléosomes contenant H2A.Z

De manière générale, la structure tridimensionnelle des nucléosomes contenant H2A.Z est similaire à celle des nucléosomes contenant H2A. H2A.Z présente 60% d'identité de séquence avec H2A et les divergences dans certaines régions spécifiques des histones différencient les structures des nucléosomes contenant H2A.Z ou H2A et pourraient expliquer leurs différences fonctionnelles (Suto *et al.*, 2000). Une des divergences principales entre H2A et H2A.Z se trouve au niveau de la boucle L1, la seule région où les deux molécules H2A.Z interagissent dans le nucléosome (Figure 1.4). Étant donné la divergence de séquence dans cette région entre H2A et H2A.Z, il semble improbable de retrouver un dimère H2A/H2B coexistant avec un dimère H2A.Z/H2B au sein d'un même nucléosome (Suto *et al.*, 2000). En effet, l'arrangement des acides aminés dans la boucle L1 causerait de l'encombrement stérique si une molécule de H2A venait à interagir avec une molécule de H2A.Z dans un même nucléosome et cet encombrement stérique déstabiliserait le nucléosome. De plus, la séquence de la boucle L1 des autres variants de H2A divergent également de la séquence canonique, suggérant que la boucle L1 représente un mécanisme afin d'assurer l'incorporation d'un seul type d'histone H2A à la fois dans le nucléosome (Suto *et al.*, 2000). Il a été démontré que H2A.Z peut former un nucléosome hybride avec H2A *in vitro*, ce qui apporterait un autre niveau fonctionnel pour une structure hybride de la chromatine (Chakravarthy *et al.*, 2004). Par contre, ce nucléosome hybride contenant H2A.Z et H2A serait instable et n'a pas encore été observé *in vivo*. La manière dont H2A.Z influence la stabilité des nucléosomes reste un sujet controversé puisque des expériences ont démontré que H2A.Z semble avoir un effet stabilisateur sur le nucléosome (Fan *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2004; Thambirajah *et al.*, 2006 et Ishibashi *et al.*, 2009) et d'autres expériences démontrent plutôt que H2A.Z a un effet déstabilisateur (Suto *et al.*, 2000; Placek *et al.*, 2005 et Zhang *et al.*, 2005).

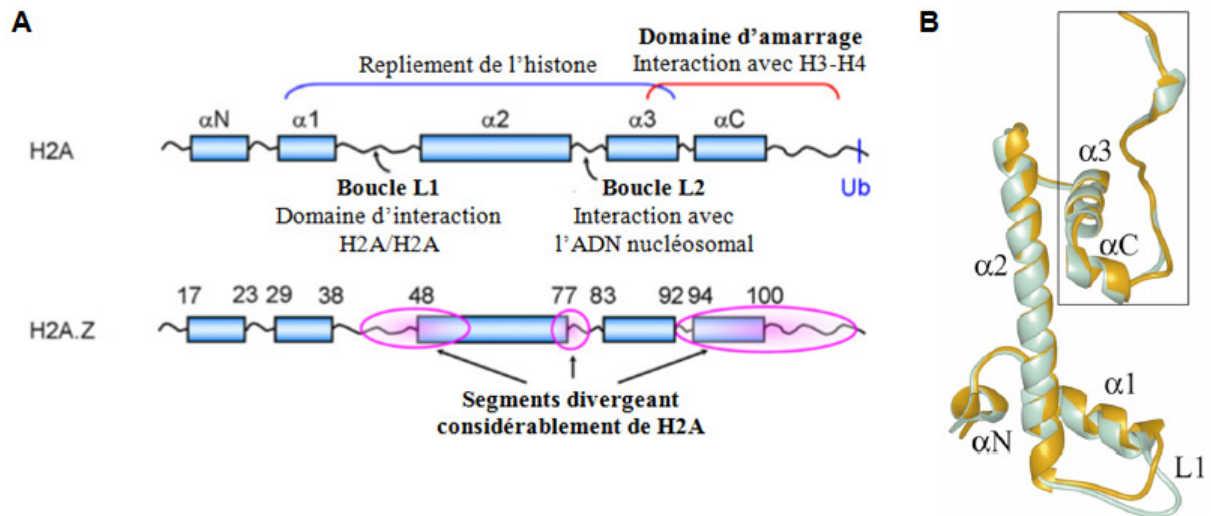


Figure 1.6 Comparaison des structures des histones H2A et H2A.Z. (A) Localisation des segments divergeant considérablement de H2A dans la structure secondaire de H2A.Z. Représentation schématique de la structure secondaire de H2A, avec ses cinq hélices α (rectangles bleus). Les parenthèses montrent le domaine de repliement de l'histone (hélices 1, 2 et 3) et le domaine d'amarrage. Les boucles L1 et L2 sont également indiquées. Les cercles roses indiquent les segments de H2A.Z divergeant considérablement de la structure de H2A. Les nombres font référence aux acides aminés incluent dans chacun des éléments de la structure de H2A.Z (Figure tirée et adaptée de Zlatanova et Thakar, 2008). (B) Superposition des structures tri-dimensionnelles des histones H2A et H2A.Z. Les différents domaines sont annotés et le domaine d'amarrage est encadré (Figure tirée et adaptée de Suto *et al.*, 2000).

La divergence principale entre les séquences de H2A et H2A.Z est le domaine d'amarrage (« docking domain ») dans la région C-terminale. Le domaine d'amarrage de H2A.Z est constitué des acides aminés 81 à 119 et cette région présente moins de 40% d'identité de séquence avec la région correspondante chez H2A. Le domaine d'amarrage contient la région M6 qui est formée par les 12 acides aminés autour de l'hélice α C. Une étude chez *Drosophila melanogaster* a révélé que lorsqu'on échange des régions de H2A.Z par les régions correspondantes de H2A, seul l'échange de la région M6 est létal pour l'embryon. Puisque H2A.Z est essentiel pour la survie et le développement de *D. melanogaster*, l'équipe a démontré que la région M6 est essentielle à la fonction unique

de H2A.Z (Clarkson *et al.*, 1999). Plus précisément, il a été démontré que les vingt derniers acides aminés de la région C-terminale de H2A.Z sont critiques pour la fonction de H2A.Z dans la résistance aux stress génotoxiques, la maintenance des frontières hétérochromatique-euchromatiques et l'activation de la transcription du gène *GALI* (Wang *et al.*, 2011). Le domaine d'amarrage forme une large surface d'interaction qui contacte le tétramère H3-H4 dans le nucléosome. La substitution de la Glu104 dans H2A par la Gly106 dans H2A.Z résulte en la perte de 3 ponts hydrogènes, ce qui causerait une légère déstabilisation de l'interaction entre H2A.Z et le tétramère H3-H4 (Suto *et al.*, 2000). De plus, le résidu His112 sur la surface du nucléosome contenant H2A.Z lie un ion manganèse, qui est partiellement stabilisé par le résidu His114, alors que la région correspondante chez H2A ne démontre pas de telles interactions. Il est probable que la localisation de cet ion sur la surface du nucléosome représenterait une interface d'interaction pour d'autres protéines telles que l'histone H1, des facteurs d'assemblage ou des complexes remodeleurs de la chromatine (Suto *et al.*, 2000).

L'extension de résidus acides de l'hélice αC dans la région C-terminale de H2A est formée de cinq acides aminés du domaine d'amarrage de H2A et d'un acide aminé de H2B (H2A : Glu 56, Glu 61, Glu 64, Asp 90, Glu 91 et Glu 92; H2B : Glu 110). Dans H2A.Z, ces six acides aminés sont conservés, mais l'extension de résidus acides est allongée par la substitution de l'Asn 94 dans H2A par un aspartate (la position correspondante chez H2A.Z est Asp 97) et la substitution de la Lys 95 dans H2A par une sérine (H2A.Z Ser 98). Ces changements dans la séquence de l'extension de résidus acides dans H2A.Z entraînent en une surface altérée du dimère H2A.Z/H2B. Ainsi, un nucléosome contenant H2A.Z possède une surface acide ininterrompue parcourant le dimère H2A.Z/H2B. Cette surface acide pourrait représenter une plateforme de liaison à des partenaires d'interactions (Suto *et al.*, 2000). Par exemple, la surface acide unique de H2A.Z pourrait servir à recruter des facteurs impliqués dans l'assemblage ou le

remodelage de la chromatine afin de réguler l'accessibilité à l'ADN et réguler des processus tels que la transcription.

1.3.2 Incorporation spécifique et localisation génomique de H2A.Z

L'incorporation du variant d'histone H2A.Z représente une manière d'altérer la structure de la chromatine et de créer des domaines chromatinien spécialisés. Il a été démontré que la localisation de H2A.Z à l'échelle du génome est non aléatoire et que H2A.Z est préférentiellement localisé aux régions promotrices et régulatrices des gènes. Cette distribution caractéristique est attribuable au recrutement spécifique de certains coactivateurs à des sites précis du génome. Plusieurs groupes de recherche ont étudié les interactions nécessaires au recrutement et à l'incorporation de H2A.Z menant à une distribution génomique particulière et leurs travaux sont résumés dans les sections suivantes.

1.3.2.1 Recrutement de coactivateurs aux promoteurs menant à l'incorporation locale de H2A.Z

Les histones ont évolué en tant que protéines hautement basiques (contenant plusieurs histidines, lysines et arginines) afin de permettre la compaction de l'ADN qui est

hautement acide. À cause de leur composition en acides aminés, les histones peuvent interagir avec d'autres acides nucléiques, des protéines cytoplasmiques ou nucléaires. Ces interactions peuvent parfois être nuisibles, c'est pourquoi des chaperonnes d'histones cachent les charges positives des histones afin de faciliter le déplacement jusqu'à l'ADN et leur incorporation dans la chromatine. En général, les chaperonnes contrôlent le repliement ainsi que l'import nucléaire des histones. Ensuite, elles livrent les histones aux complexes remodeleurs de la chromatine ATP-dépendants qui les incorporent dans la chromatine (Skene et Henikoff, 2013). Deux chaperonnes de H2A.Z ont été identifiées, soient Nap1 et Chz1 (Ishimi et Kikuchi, 1991 et Luk *et al.*, 2007). Leurs fonctions sont redondantes puisqu'elles sont responsables de lier les dimères H2A.Z/H2B au niveau du cytoplasme, d'importer les dimères dans le noyau et de les livrer au complexe remodeleur de la chromatine qui échangera le dimère H2A/H2B dans la chromatine pour le dimère H2A.Z/H2B. De manière intéressante, la chaperonne Nap1 lie les dimères H2A.Z/H2B, mais aussi les dimères H2A/H2B contrairement à la chaperonne Chz1 qui possède une séquence motif hautement conservée (CHZ) qui reconnaît spécifiquement les dimères H2A.Z/H2B (Luk *et al.*, 2007). La chaperonne Nap1 est donc impliquée dans la déposition d'histone de manière dépendante à la réplication, mais aussi dans la déposition des variants d'histones indépendamment de la réplication.

Le complexe SWR1 est un complexe ATP-dépendant de la famille SWI/SNF qui est responsable de l'échange des dimères H2A/H2B pour H2A.Z/H2B dans la chromatine chez *Saccharomyces cerevisiae* (Krogan *et al.*, 2003; Kobor *et al.*, 2004; Mizuguchi *et al.*, 2004; Luk *et al.*, 2010 et Papamichos-Chronakis *et al.*, 2011). Il a été démontré que la sous-unité Swc2 du complexe SWR1 est responsable de la reconnaissance et la liaison de la région C-terminale de H2A.Z pour son incorporation dans la chromatine (Mizuguchi *et al.*, 2004 et Wu *et al.*, 2005). En effet, Wang *et al.* (2011) ont démontré que l'incorporation de H2A.Z dans la chromatine est perdue lorsque la région C-terminale est

tronquée, mais que cette perte d'association de H2A.Z à la chromatine est indépendante de la liaison de H2A.Z à la sous-unité Swc2. De plus, la présence de la région C-terminale n'est pas critique pour la liaison de H2A.Z avec SWR1-C, l'histone H2B ainsi que Chz1, la chaperonne spécifique à H2A.Z. La région C-terminale n'est donc pas nécessaire pour l'interaction avec SWR1-C. On pense que la région C-terminale de H2A.Z serait nécessaire suite à l'incorporation dans la chromatine par SWR1-C afin de retenir l'histone dans la chromatine (Wang *et al.*, 2011). Le complexe SWR1 est composé de 12 ou 13 sous-unités protéiques incluant sa sous-unité catalytique Swr1 (Swi2/Snf2-related 1), qui possède un domaine ATPase/helicase. Contrairement aux autres protéines ATPases de la famille SWI/SNF, le domaine ATPase Swr1 possède une insertion séparant le segment en deux sous-unités, soient Swr1 et Eaf1 (Figure 1.5a). La sous-unité catalytique Swr1 s'assemblera dans le complexe SWR1 alors que la sous-unité Eaf1 fait partie du complexe acétyl transférase NuA4, où elle agit comme plateforme d'assemblage pour les sous-unités de NuA4. Chez l'humain, les homologues des sous-unités Swr1 et Eaf1 forment une protéine nommée p400/hDomino. De manière intéressante, Auger et al. (2008) ont créé une protéine chimérique possédant les domaines HSA et SANT de la sous-unité Eaf1 et le domaine SWI/SNF de Swr1 de la levure. Cette protéine de fusion, possédant des domaines homologues à la protéine humaine p400/hDomino, confère la même fonction que Eaf1 *in vivo* et permet d'incorporer H2A.Z dans la chromatine (Auger *et al.*, 2008). Ce complexe procure l'activité acétyltransférase ainsi que l'activité d'échange des histones dépendant de l'ATP (Figure tirée et adaptée de Altaf *et al.*, 2009).

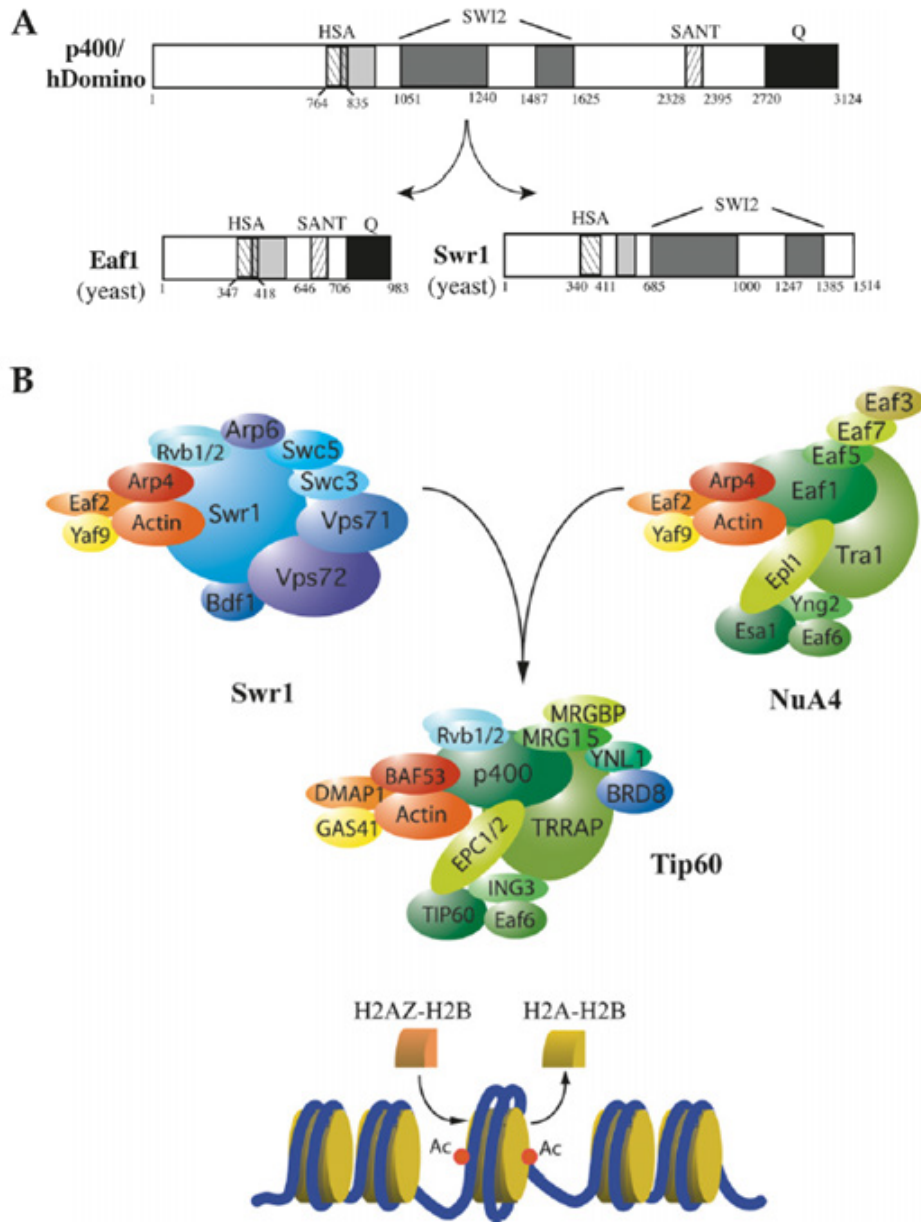


Figure 1.7 Conservation de la structure et de la fonction de l'histone acétyltransférase NuA4 et du complexe ATP-dépendant remodeleur de la chromatine SWR1 de la levure aux humains. (A) Représentation schématique mettant en évidence la conservation et les liens structuraux et fonctionnels entre le complexe humain p400/hDomino et les protéines Eaf1 et Swr1 chez la levure. (B) Représentation schématique du complexe acétyltransférase NuA4, du complexe remodeleur de la chromatine SWR1 chez la levure et de l'homologue humain de NuA4, hNuA4/Tip60. Les protéines des complexes NuA4 et SWR1, distincts physiquement chez la levure, sont conservés à travers l'évolution et forment un seul complexe chez l'humain, hNuA4/Tip60.

Le complexe SWR1 est responsable d'incorporer H2A.Z dans des endroits spécifiques du génome afin de créer des domaines de chromatine spécialisés tels que les régions promotrices et régulatrices. L'incorporation spécifique de H2A.Z dans la chromatine et sa localisation génomique dépendent donc du recrutement du complexe SWR1 à des sites génomiques précis. Chez la levure, il existe une coopération entre le complexe SWR1 et l'histone acétyl transférase NuA4 qui mène au recrutement spécifique de SWR1 et à l'incorporation de H2A.Z au niveau des promoteurs. La sous-unité Esa1 du complexe NuA4 possède une activité acétyl transférase et est responsable de l'acétylation de 4 lysines conservées des queues N-terminales des histones H2A et H4 (Clarke *et al.*, 1999). NuA4 est ciblé aux promoteurs par des facteurs de transcription liant l'ADN et crée des régions de la chromatine acétylées sur H2A et H4 (Altaf *et al.*, 2010). La sous-unité Bdf1 (Bromodomain factor 1) de SWR1-C possède deux bromodomains qui reconnaissent et lient les queues des histones H4 acétylées par NuA4 (Boudreault *et al.*, 2003; Ladurner *et al.*, 2003; Matangkasombut et Buratowski, 2003; Kobor *et al.*, 2004 et Durant et Pugh, 2007). Une fois le complexe SWR1 recruté spécifiquement aux promoteurs par sa sous-unité Bdf1, il incorporera H2A.Z dans les nucléosomes locaux (Figure 1.6). Supportant cette coopération entre NuA4 et SWR1-C menant à l'incorporation de H2A.Z, la délétion de BDF1 ou des mutations ponctuelles des lysines des histones H3 ou H4 diminuent l'incorporation de H2A.Z dans la chromatine (Raisner *et al.*, 2005 et Zhang *et al.*, 2005). De plus, lorsque le variant H2A.Z est incorporé dans la chromatine par SWR1-C, NuA4 peut acétyler la région N-terminale de H2A.Z. On suppose que l'acétylation de H2A.Z serait impliquée dans la déstabilisation des nucléosomes aux promoteurs pendant l'activation de la transcription (Keogh *et al.*, 2006; Babiarz *et al.*, 2006 et Millar *et al.*, 2006). Aussi, la sous-unité Gcn5 du complexe SAGA, un complexe acétyl transférase chez la levure, possède une activité acétyl transférase et peut également acétyler les histones H2B et H3 du promoteur (Keogh *et al.*, 2006 et Mehta *et al.*, 2010). De manière cohérente, les mutants *ESAI* et *GCN5* occasionnent une diminution de l'association de H2A.Z au niveau des promoteurs (Raisner *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Durant et Pugh, 2007 et Auger *et al.*, 2008).

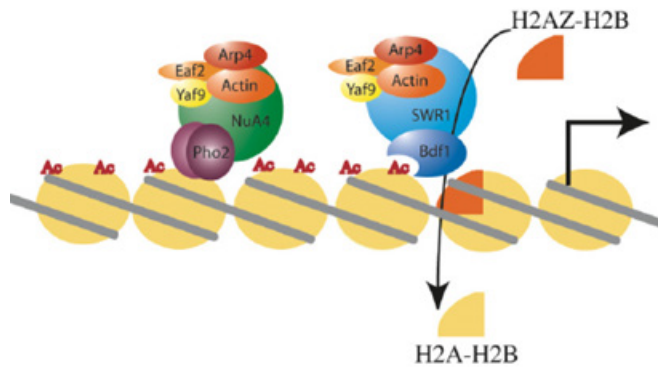


Figure 1.8 Coopération entre le complexe SWR1 et l'histone acétyltransférase NuA4 pendant la régulation de la transcription. Chez la levure, les complexes NuA4 et SWR1 coopèrent afin de préparer la structure de la chromatine au niveau du promoteur pour une activation de la transcription rapide. NuA4 est recruté par un facteur de transcription préalablement lié au promoteur et acétyle les queues N-terminales des histones H4 locales. Les acétylations sur H4 sont reconnues par les bromodomains de la sous-unité Bdf1 du complexe SWR1 permettant le recrutement local de SWR1 et l'incorporation du dimère H2A.Z-H2B (Figure tirée et adaptée de Altaf *et al.*, 2009).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les complexes SWR1 et NuA4 sont séparés physiquement, mais ils partagent 4 sous-unités, soient Yaf9, Swc4, Arp4 et Act1. Des complexes remodeleurs de la chromatine homologues aux complexes SWR1 et NuA4 ont été découverts chez les mammifères (Kusch *et al.*, 2004; Ruhl *et al.*, 2006; Gévy *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2007 et Cuadrado *et al.*, 2011). En fait, NuA4 et SWR1-C sont liés fonctionnellement et sont physiquement associés chez les eucaryotes supérieurs. Ces complexes sont hautement conservés à travers l'évolution et présentent des sous-unités homologues à travers les organismes eucaryotes. Chez l'humain, deux complexes remodeleurs de la chromatine ATP-dépendants peuvent incorporer H2A.Z dans la chromatine, soient TIP60 et SRCAP. Le complexe TIP60 consiste en une fusion entre SWR1-C et NuA4 de la levure formant un seul complexe et possède des sous-unités homologues aux deux complexes (Figure 1.5b) (Doyon *et al.*, 2004). Le complexe TIP60 de la famille SWI/SNF possède la sous-unité ATPase p400, homologue aux sous-unités Swr1 et Eaf1 chez la levure (Fuchs *et al.*, 2001). Le complexe TIP60 possède la sous-unité Brd8, homologue à Bdf1 du complexe SWR1 chez la levure, capable de reconnaître

et de lier les queues des histones H4 acétylées grâce à ses bromodomaines (Doyon et Côté, 2004). Aussi, le complexe TIP60 comporte la sous-unité Tip60, homologue à Esa1 du complexe NuA4, qui possède une activité acétyl transférase. Ainsi, le complexe TIP60 peut donc cibler les promoteurs en reconnaissant les histones acétylées, échanger H2A/H2B pour H2A.Z/H2B ainsi qu'acétyler les histones, dont la queue N-terminale de H2A.Z. Le complexe SRCAP (SWI2/SNF2-related CBP activator protein) est homologue au complexe SWR1-C seulement, il possède des sous-unités homologues à presque toutes les sous-unités de SWR1-C, incluant les 4 sous-unités partagées avec NuA4 chez la levure. Ce complexe comporte la sous-unité ATPase p400 permettant l'incorporation des dimères H2A.Z/H2B dans la chromatine (Ruhl *et al.*, 2006). Par contre, le complexe SRCAP ne possède pas de sous-unité Tip60, homologue à Esa1, et ne peut donc pas acétyler les queues N-terminales des histones H2A et H4 (Cai *et al.*, 2005). Chez *Arabidopsis thaliana*, le complexe PIE1, homologue au complexe SWR1 chez la levure, interagit avec H2A.Z et est nécessaire pour son incorporation dans la chromatine (Choi *et al.*, 2007; Deal *et al.*, 2007 et March-Diaz *et al.*, 2008). Chez *Drosophila melanogaster*, la sous-unité Domino/p400 du complexe Tip60 est homologue à Swr1 et peut catalyser l'échange de H2Av *in vitro* (Kusch *et al.*, 2004).

Bien qu'il ait été démontré que le complexe SWR1 est responsable de l'incorporation spécifique de H2A.Z au niveau des promoteurs, on pense que la région dépourvue de nucléosomes (« nucleosome-free region ») est un signal plus spécifique pour la déposition de H2A.Z aux promoteurs. La région NFR est une région d'environ 150 paires de bases (pb) d'ADN dépourvue de nucléosomes qui se trouve à environ 200 pb du site d'initiation de la transcription chez la levure (Yuan *et al.*, 2005). La séquence de cette région d'ADN accessible est relativement conservée et contient des sites de liaison pour des facteurs généraux de la transcription. Environ 70% des gènes possèdent des régions NFR flanquées par deux nucléosomes contenant H2A.Z et 30% des gènes possèdent un

ou aucun H2A.Z dans les nucléosomes flanquant la région NFR. Dans une expérience de Raisner et al. (2005), un segment d'environ 22 pb provenant du promoteur du gène *SNT1* a été introduit au milieu d'une région codante. De manière surprenante, l'introduction de ce segment était suffisante pour former une nouvelle région NFR flanquée par deux nucléosomes contenant H2A.Z. Ainsi, il semble que la région dépourvue de nucléosomes induit l'incorporation de H2A.Z dans les nucléosomes locaux, et non le contraire. En somme, il semble exister au moins deux manières par lesquelles le complexe SWR1 est ciblé aux promoteurs, la première est dépendante de l'acétylation des histones au niveau du promoteur et la seconde est dépendante d'une séquence d'ADN appropriée dans la région dépourvue de nucléosomes (NFR).

1.3.2.2 Localisation génomique de H2A.Z

Les mécanismes par lesquels H2A.Z régule la transcription, le silençage des gènes, la stabilité du génome et le développement ne sont pas clairement définis, mais l'étude de la distribution génomique de H2A.Z peut nous informer sur les rôles du variant dans différentes régions. En effet, plusieurs groupes de recherche ont réalisé des méthodes de localisation de H2A.Z à l'échelle du génome afin d'étudier les rôles et les mécanismes de ce variant dans la cellule.

Une étude de localisation génomique de H2A.Z par immunofluorescence chez *D. melanogaster* a révélé que H2A.Z est incorporé à la grandeur du génome, mais que sa

distribution n'est pas uniforme et non-aléatoire (Leach *et al.*, 2000). On pense que H2A.Z se trouve préférentiellement dans certaines régions spécifiques du génome séparées par des régions comportant les histones canoniques. D'un autre côté, H2A étant une histone canonique, elle est déposée dans la chromatine de manière dépendante à la réplication de l'ADN en phase S et possède une distribution génomique uniforme. Plusieurs groupes de recherche ont utilisé la méthode de co-immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) afin de déterminer si H2A.Z est préférentiellement trouvé dans de larges domaines chromosomiques ou si H2A.Z est associé à des régions spécifiques le long des chromosomes. Chez les eucaryotes, H2A.Z est enrichie à la majorité des sites d'initiation de la transcription (TSS) de gènes régulés par l'ARN polymérase II, mais aussi dans les régions régulatrices comme des amplificateurs et des éléments de frontière (Subramanian *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2013 et Ku *et al.*, 2012). Chez *S. cerevisiae*, il a initialement été démontré que H2A.Z est enrichi dans les régions promotrices à comparer aux corps des gènes aux loci *GAL1*, *PHO5* et *PUR5*. Aussi, il a été démontré que la distribution de H2A est uniforme dans les régions promotrices de ces loci (Leach *et al.*, 2000; Santisteban *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 2001 et Larochelle et Gaudreau, 2003). Par la suite, plusieurs analyses de H2A.Z à l'échelle du génome par co-immunoprécipitation de la chromatine couplée aux puces à ADN (ChIP-chip) ont démontré que H2A.Z est trouvé préférentiellement dans les régions promotrices et les régions régulatrices des gènes (Zhang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Raisner *et al.*, 2005; Guillemette *et al.*, 2005; Barski *et al.*, 2007; Mavrich *et al.*, 2008; Albert *et al.*, 2007).

Guillemette *et al.* (2005) estiment qu'environ 63% des promoteurs du génome de la levure contiennent H2A.Z et que ces loci H2A.Z sont distribués de manière uniforme dans le génome (Figure 1.7). Zhang *et al.* (2005) ont observé que H2A.Z est préférentiellement trouvé dans les promoteurs sans séquence TATA servant de lieu de reconnaissance à l'ARN polymérase II chez les eucaryotes. Selon Raisner *et al.* (2005),

les gènes qui ne disposent pas de H2A.Z dans leurs promoteurs correspondent aux gènes dans la cassette silencieuse HML α , les gènes près des télomères, les cadres de lecture incertains et des gènes euchromatiques qui pourraient se trouver près de la frontière avec l'hétérochromatine. Bien que la plupart des études sur la localisation génomique de H2A.Z semblent cibler spécifiquement les promoteurs, on observe également une incorporation aléatoire de H2A.Z à faible niveau dans le corps des gènes (Hardy *et al.*, 2009 et Hardy *et al.*, 2010). En plus de l'enrichissement de H2A.Z aux promoteurs chez *Arabidopsis*, un niveau considérable de H2A.Z est observé dans les régions codantes (Zilberman *et al.*, 2008 et Coleman-Derr et Zilberman, 2012). On suppose que la présence de H2A.Z dans le corps des gènes représente une mauvaise incorporation et que la localisation adéquate du variant requiert une déposition spécifique au promoteur par le complexe SWR1, mais également une restriction active du variant des corps des gènes par des chaperonnes d'histones telles que FACT et Spt6 (Jeronimo *et al.*, 2015).

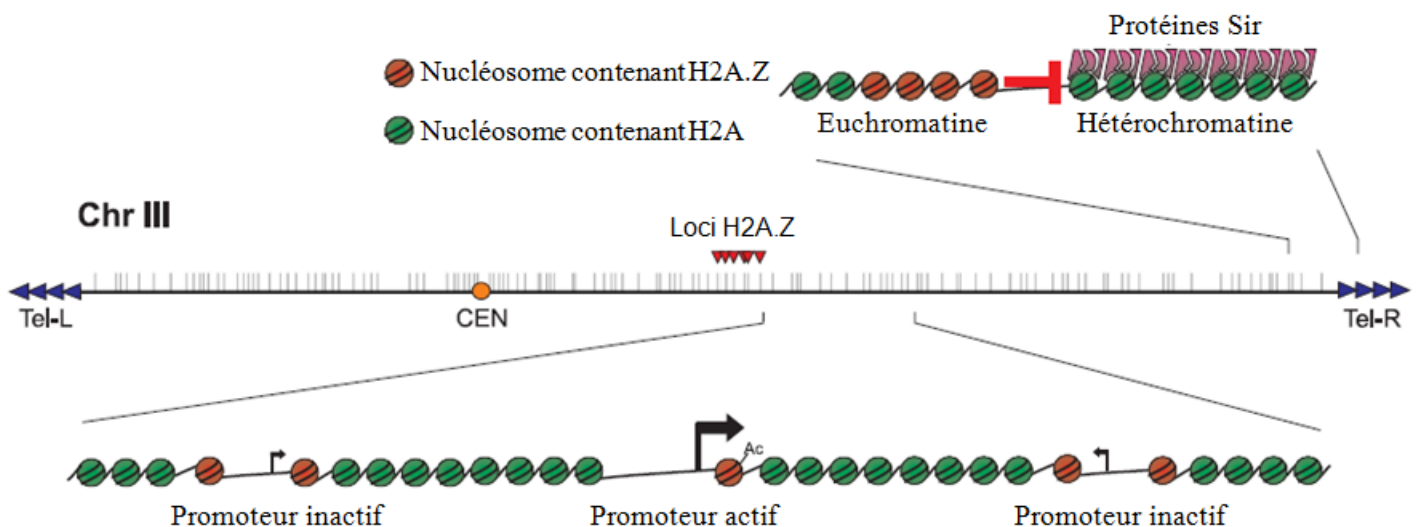


Figure 1.9 Schéma récapitulatif de la localisation de H2A.Z à l'échelle du génome chez *S. cerevisiae*. Le chromosome III est représenté avec les régions télomériques (Tel-L et Tel-R) et centromérique (CEN). Les loci H2A.Z distribués de manière stochastique sur le chromosome sont représentés par des lignes verticales grises. La figure montre l'incorporation de H2A.Z près des télomères (haut) et dans les autres régions génomiques (bas) (Figure tirée et adaptée de Guillemette et Gaudreau, 2006).

Les domaines HZAD identifiés chez *S. cerevisiae* contiennent des gènes régulés par H2A.Z par l'entremise de son rôle de protection contre le silençage télomérique (Meneghini *et al.*, 2003). Ces gènes présentent une distribution de H2A.Z différente des autres gènes régulés par le variant, soit une distribution débordant les promoteurs et occupant le corps des gènes également (Guillemette *et al.*, 2005) (Figure 1.8). Le variant d'histone H2A.Z empêcherait l'étalement de l'hétérochromatine et protégerait l'euchromatine du silençage télomérique. En effet, la délétion de *HTZI* chez la levure permet l'action des protéines déacétylases Sir dans ces régions et l'étalement de l'hétérochromatine jusqu'à ces sites menant au silençage des gènes HZAD (Meneghini *et al.*, 2003).

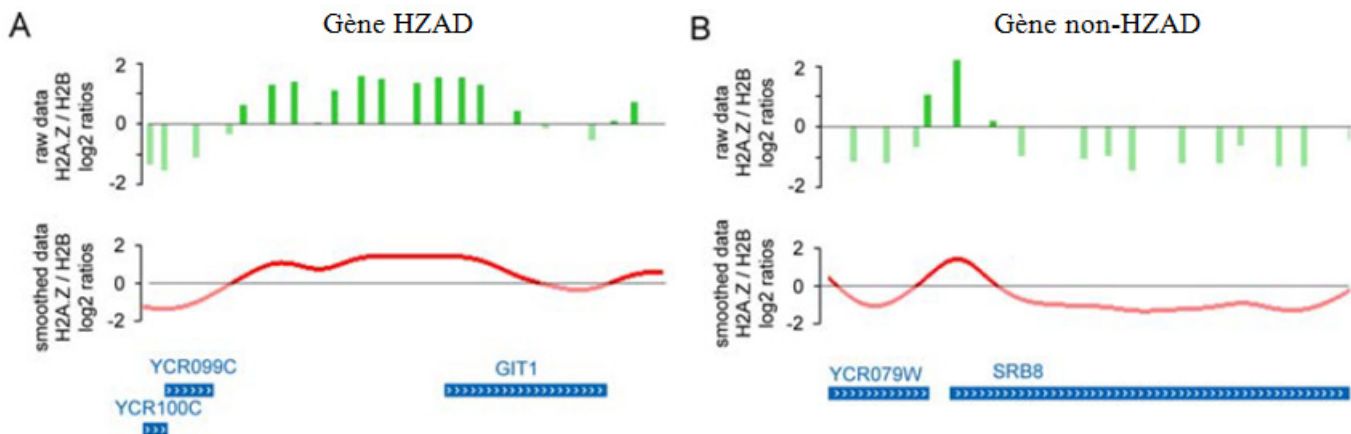


Figure 1.10 Comparaison de la localisation de H2A.Z à un gène HZAD et non-HZAD par la méthode d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) couplée à la puce à ADN. (A) Les données brutes (vert) et lissées (rouge) des ratios H2A.Z/H2B log2 obtenues par les expériences de puce à ADN sont montrées pour une région de 5 KB autour du gène *GIT1*. Le gène *GIT1* est un gène HZAD, et pour ce locus, la localisation de H2A.Z débord le promoteur et s'étale dans le corps du gène. (B) Les données brutes (vert) et lissées (rouge) sont également montrées pour une région de 5 KB autour du gène *SRB8*, un gène non-HZAD. Pour ce locus, la localisation de H2A.Z est restreinte au promoteur du gène *SRB8* (Figure tirée et adaptée de Guillemette *et al.*, 2005).

Cette localisation spéciale de H2A.Z est également observée pour plusieurs gènes près des télomères qui ne sont pas des gènes HZAD. De manière similaire aux gènes HZAD, H2A.Z empêcherait également l'étalement de l'hétérochromatine et protégerait ces gènes sous-télomériques non-HZAD du silençage télomérique (Guillemette *et al.*, 2005). De manière intéressante, H2A.Z est trouvé dans les éléments isolateurs dans les cellules de mammifères, supportant le rôle de H2A.Z dans le maintien des barrières hétérochromatique-euchromatique. Ces éléments isolateurs sont des séquences d'ADN qui se trouvent entre deux gènes ou deux groupes de gènes afin de prévenir l'étalement de l'hétérochromatine (Barski *et al.*, 2007 et Bruce *et al.*, 2005). Aussi, H2A.Z est responsable du maintien de l'hétérochromatine péricentromérique pour assurer une formation adéquate du centromère (Greaves *et al.*, 2007).

Il semble évident que les différents rôles de H2A.Z dans la régulation de la transcription sont liés à sa localisation à travers le génome. En effet, lorsque H2A.Z est trouvé dans les promoteurs, il est associé à la régulation de la transcription et est activement restreint du corps des gènes. D'un autre côté, lorsque H2A.Z est trouvé dans le corps des gènes sous-télomériques, il joue plutôt un rôle antagoniste au silençage télomérique pour les gènes HZAD et certains gènes sous-télomériques.

1.3.3 Implication de H2A.Z dans la régulation de la transcription

Allis et al. (1980) ont observé que hv1, la version de H2A.Z chez *Tetrahymena thermophila*, est localisé dans les macronoyaux transcriptionnellement actifs, et non dans les micronoyaux inactifs et ont initialement suggéré que H2A.Z joue un rôle positif dans la régulation de la transcription. Par la suite, plusieurs études chez *S. cerevisiae* ont révélé que H2A.Z est impliqué dans la régulation positive et négative de la transcription des gènes (Dhillon et Kamakaka, 2000; Santisteban *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 2001; Meneghini *et al.*, 2003). Il a été démontré que la délétion de *HTZ1* chez *S. cerevisiae* affecte négativement l'induction de la transcription des gènes *GAL* (Santisteban *et al.*, 2000 et Adam *et al.*, 2001), *PHO5* (Santisteban *et al.*, 2000), *PUR5* (Larochelle et Gaudreau, 2003), *CLN5* et *CLB2* (Dhillon *et al.*, 2006) et des gènes activés en réponse aux chocs thermiques (Zhang *et al.*, 2005). De plus, la comparaison des transcriptomes d'une souche de type sauvage et d'une souche mutante *htz1Δ* a permis d'identifier 214 gènes activés et 109 gènes réprimés par H2A.Z (Meneghini *et al.*, 2003). Le nombre de gènes activés par H2A.Z pourrait être plus élevé puisque H2A.Z régule l'expression de plusieurs gènes inductibles dans différentes conditions spécifiques. Aussi, on suppose que le variant pourrait réguler l'expression de certains gènes de manière négative en facilitant la liaison de répresseurs aux promoteurs.

Il est évident que H2A.Z joue un rôle dans la régulation de la transcription génique, mais les mécanismes par lesquels H2A.Z module la transcription des gènes de manière positive et négative ne sont pas encore élucidés. Chez la levure, on pense que H2A.Z régule la transcription en positionnant adéquatement les nucléosomes (Guillemette *et al.*, 2005), en déstabilisant les nucléosomes (Zhang *et al.*, 2005) et/ou en contactant des coactivateurs

ou des composantes de la machinerie de la transcription (Adam *et al.*, 2001 et Lemieux *et al.*, 2004). En effet, un défaut de recrutement des complexes Swi/Snf, SAGA et du médiateur au promoteur du gène *GALI* a été observé dans des cellules mutantes *htz1Δ* (Lemieux *et al.*, 2004). Chez les mammifères, H2A.Z est important pour la réorganisation locale de la chromatine et la régulation de la transactivation de la transcription par des facteurs de transcription tels que p53 (Gévry *et al.*, 2007) et des récepteurs nucléaires (Gévry *et al.*, 2009 et John *et al.*, 2008). De manière intéressante, le rôle de H2A.Z dans la régulation de la transcription semble différer selon sa localisation génomique, par exemple son rôle de modulateur de la transcription aux régions promotrices et son rôle de protection contre l'étalement de l'hétérochromatine aux gènes sous-télomériques. On pense que H2A.Z joue un double rôle dans la régulation de l'expression selon sa localisation en préparant les gènes inactifs pour l'induction rapide de la transcription dans l'euchromatine ou en protégeant l'euchromatine du silençage des gènes. Les mécanismes de régulation de la transcription par H2A.Z ne sont pas encore élucidés, mais il existe des évidences qui impliquent sa localisation aux promoteurs ainsi que le recrutement de protéines nucléaires. Les sections qui suivent détaillent quelques mécanismes par lesquels H2A.Z pourrait moduler la transcription des gènes.

1.3.3.1 Rôle de H2A.Z dans la régulation de la transcription selon sa localisation génomique

L'activation de la transcription est un processus comportant plusieurs étapes qui peuvent varier selon le groupe de gènes. Connaissant les étapes générales de l'activation de la transcription (Figure 1.9), il semble évident que H2A.Z est impliqué dans l'étape de remodelage des nucléosomes flanquant la région NFR.

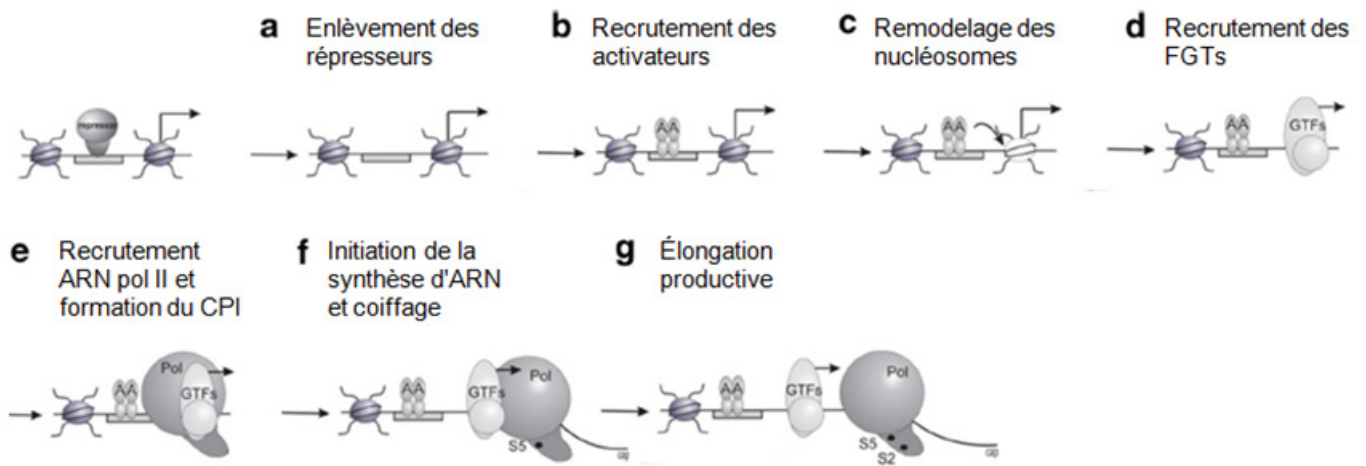


Figure 1.11 Schéma décrivant les étapes de l'activation de la transcription des gènes inductibles. Le cycle d'activation de la transcription inclut les étapes suivantes: l'enlèvement des répresseurs de la transcription liant directement l'ADN dans la région dépourvue de nucléosomes (NFR) (A). Le recrutement d'activateurs (B) qui permettront un remodelage de la chromatine et l'incorporation des dimères H2A.Z-H2B dans les nucléosomes flanquant la région NFR (C). Le recrutement de facteurs généraux de la transcription (FGTs) (D) menant au recrutement de l'ARN polymérase II et à la formation du complexe de préinitiation de la transcription (CPI) (E). La phosphorylation de la sérine 5 du domaine répété en C-terminal de l'ARN polymérase II est le signal pour l'initiation de la synthèse d'ARN et le coiffage en 5' de l'ARNm naissant (F). La phosphorylation subséquente de la sérine 2 de l'ARN polymérase II permet la transition du complexe de préinitiation en complexe d'élongation (Figure tirée et adaptée de Krasnov *et al.*, 2016).

En effet, la localisation de H2A.Z aux promoteurs semble importante pour son rôle dans l'activation de la transcription, puisque la composition des nucléosomes flanquant la région NFR influence la stabilité des nucléosomes et l'état de la transcription (Subramanian *et al.*, 2015). Chez les eucaryotes, la région NFR se trouve immédiatement en amont du site d'initiation de la transcription (TSS) et les nucléosomes flanquant la région NFR sont enrichis en H2A.Z (Raisner *et al.*, 2005; Guillemette *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Millar *et al.*, 2006 et Albert *et al.*, 2007). Le nucléosome en aval du TSS est appelé le nucléosome +1 et représente une barrière à l'initiation de la transcription et à l'élongation. Suite à la formation du complexe de préinitiation de la transcription au TSS, ce nucléosome empêche le passage de l'ARNpolII et la transition entre le complexe

d'initiation et le complexe d'élongation (Rhee et Pugh, 2012; Nock *et al.*, 2012 et Weber *et al.*, 2014). Lorsque le nucléosome +1 est enrichi en H2A.Z, le blocage de l'ARNpolII est diminué suggérant que l'incorporation de H2A.Z réduit la barrière énergétique pour la progression de l'ARNpolII. L'incorporation de H2A.Z dans le nucléosome +1 permet donc de moduler la cinétique de l'ARNpolII et diminue l'énergie nécessaire pour la progression de l'enzyme et pour l'élongation (Figure 1.10). Ainsi, l'implication de H2A.Z dans l'étape de remodelage des nucléosomes flanquant la région NFR semble indispensable à une activation de la transcription efficace puisque le nucléosome +1 prévient la formation du complexe de préinitiation et la progression de l'ARN polymérase II.

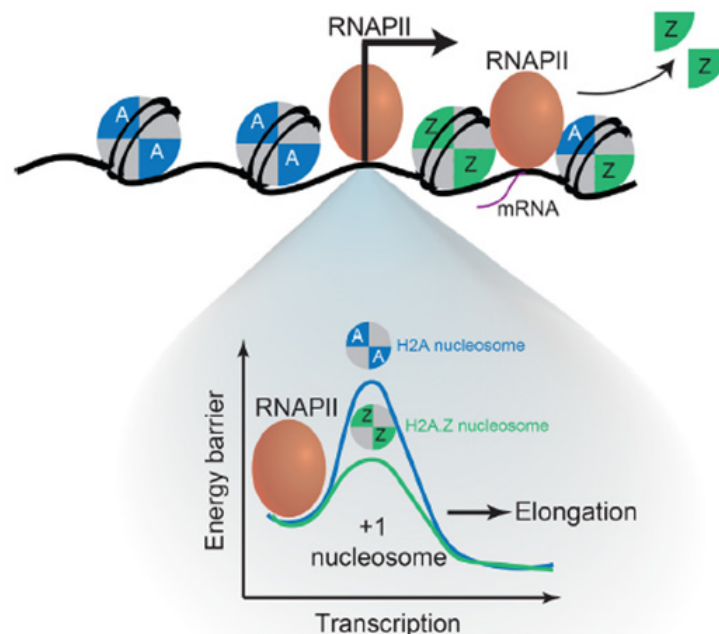


Figure 1.12 Les nucléosomes contenant H2A.Z aux promoteurs influencent la stabilité nucléosomale et l'état transcriptionnel. (Haut) La transition des nucléosomes contenant H2A.Z de manière homotypique à hétérotypique peut réguler l'activation génique via la régulation de l'élongation transcriptionnelle. (Bas) Les nucléosomes contenant H2A.Z peuvent influencer la stabilité du nucléosome +1 et la progression de l'ARN polymérase II (Figure tirée et adaptée de Subramanian *et al.*, 2015).

Chez *S. cerevisiae*, puisque H2A.Z est associé aux promoteurs de gènes inductibles sous répression ou qui présentent un niveau d'expression basal, on suppose que H2A.Z est localisé dans les promoteurs de gènes inactifs ou très peu transcrits (Guillemette *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005 et Millar *et al.*, 2006). Une délétion de H2A.Z ne cause pas une dérégulation des gènes inductibles, mais la délétion cause une transcription diminuée dans des conditions induites. Il a été démontré que les promoteurs de gènes hautement transcrits, tels que *ACT1* et *ADHI*, sont plutôt dépourvus de nucléosomes (Boeger *et al.*, 2003; Boeger *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2004; Reinke et Horz, 2003 et Schwabish et Struhl, 2004). On pense que l'incorporation de H2A.Z au niveau des promoteurs forme une structure de la chromatine spéciale qui prépare les nucléosomes à être désassemblés suite à l'activation de la transcription de ces gènes (Guillemette *et al.*, 2005). Les promoteurs contenant H2A.Z possèdent des nucléosomes organisés et des régions dépourvues de nucléosomes définies contrairement aux promoteurs où H2A.Z est absent (Yuan *et al.*, 2005 et Guillemette *et al.*, 2005). En effet, un essai de cartographie du positionnement des nucléosomes de haute résolution a permis de confirmer le déplacement de nucléosomes spécifiques au promoteur du gène *GALI* lorsque H2A.Z est absent (Guillemette *et al.*, 2005). Ainsi, on pense que par son positionnement au promoteur de gènes inactifs chez la levure, H2A.Z prépare la structure de la chromatine pour le recrutement adéquat de la machinerie transcriptionnelle et l'induction de la transcription. Contrairement à l'enrichissement de H2A.Z au promoteur, une corrélation négative est observée entre l'incorporation de façon aléatoire et à faible niveau de H2A.Z dans le corps des gènes et la transcription (Barski *et al.*, 2007; Hardy *et al.*, 2009 et Zemach *et al.*, 2010). Ainsi, on suppose que la localisation de H2A.Z au promoteur, et non dans le corps des gènes, est importante dans la régulation de la transcription.

De manière différente à la levure où H2A.Z marque les promoteurs des gènes inactifs ou très peu transcrits, chez les cellules de mammifères, des études ont démontré que H2A.Z

peut être associé à des gènes inactifs, mais aussi souvent associé aux promoteurs de gènes dont l'expression est activée (Barski *et al.*, 2007). H2A.Z montre une corrélation positive avec la transcription chez les animaux, puisque chez les humains et *Drosophila melanogaster*, l'enrichissement de H2A.Z au promoteur corrèle avec le niveau d'expression génique (Barski *et al.*, 2007 et Mavrich *et al.*, 2008). L'inactivation de H2A.Z par ARN interférent dans les cellules de mammifères cause l'activation de la transcription de certains gènes et la répression d'autres gènes. Par exemple, l'inactivation de H2A.Z entraîne une dérégulation du gène *p21* dans les fibroblastes humains, suggérant que H2A.Z a un rôle répressif dans la régulation de l'expression de *p21* (Gévry *et al.*, 2007). D'un autre côté, l'inactivation du complexe SRCAP, homologue du complexe SWR1 chez la levure et responsable d'incorporer H2A.Z aux promoteurs, entraîne une expression réduite des gènes *SP-1* et *G3BP*, suggérant que H2A.Z joue un rôle activateur dans la régulation de l'expression de ces gènes (Wong *et al.*, 2007). Une des manières dont H2A.Z pourrait réguler l'activation et la répression de la transcription est le maintien d'une structure de la chromatine ouverte ou en équilibre aux promoteurs qui rend les séquences régulatrices accessibles pour les activateurs et les répresseurs de la transcription. Il est important que les séquences régulatrices soient accessibles et que les activateurs ou répresseurs puissent être rapidement recrutés ou changés aux promoteurs afin de permettre à la cellule d'adapter rapidement l'état transcriptionnel de certains gènes en réponse aux signaux environnementaux (Kornberg et Lorch, 1999).

De manière intéressante, H2A.Z joue un rôle dans la régulation de l'expression des gènes à proximité des télomères, puisqu'environ la moitié des 214 gènes activés par H2A.Z sont regroupés dans des domaines à une distance d'environ 30 à 40 kb des télomères, nommés domaines activés par Htz1 (HZAD) (Meneghini *et al.*, 2003 et Guillemette et Gaudreau, 2006). Les gènes réprimés par H2A.Z présentent quant à eux une distribution génomique plus aléatoire. Pour les gènes sous-télomériques activés par H2A.Z, le variant est localisé

dans le promoteur, mais sa localisation déborde les promoteurs et s'étend également dans le corps des gènes (Guillemette *et al.*, 2005). On suppose que H2A.Z empêche l'étalement de l'hétérochromatine permettant par le fait même l'expression de ces gènes. Lorsque H2A.Z est absent dans les régions sous-télomériques, les protéines déacétylases Sir déacétylent les histones H4 et permettent leur déméthylation sur la lysine 4, ce qui mène au silençage de l'expression des gènes. L'acétylation de H4 et sa méthylation sur la lysine 4 sont des marques euchromatiques. Un double mutant par délétion de H2A.Z et de Sir2 empêche l'étalement de l'hétérochromatine et le silençage des gènes dans les régions sous-télomériques. Cette observation suggère que la présence de H2A.Z dans ces gènes les protège du silençage télomérique dépendant des protéines Sir. De façon similaire, des analyses de ChIP dans les cellules de mammifères ont permis de démontrer que H2A.Z se trouve dans les éléments isolateurs qui préviennent l'étalement de l'hétérochromatine d'un gène silencé à un gène activement transcrit (Barski *et al.*, 2007 et Bruce *et al.*, 2005). Par exemple, il a été démontré que H2A.Z est localisé dans les éléments isolateurs du locus β -globine chez le poulet (Bruce *et al.*, 2005). Les isolateurs sont particulièrement utiles lorsque deux gènes à proximité possèdent des états transcriptionnels différents. Puisque H2A.Z est retrouvé dans le corps des gènes actifs sous-télomériques et dans les éléments isolateurs, il a été établi que H2A.Z est impliqué dans l'établissement des barrières entre l'hétérochromatine et l'euchromatine, ce qui lui permet de moduler la transcription des gènes à un autre niveau.

1.3.3.2 Rôle de H2A.Z dans le recrutement de protéines nucléaires menant à la régulation de la transcription

La divergence principale entre les nucléosomes contenant H2A et ceux contenant H2A.Z se trouve dans le domaine d'amarrage dans la région C-terminale de H2A.Z, qui présente moins de 40% d'identité de séquence avec la région C-terminale de H2A. Les nucléosomes contenant H2A.Z possèdent une extension de huit résidus acides s'étalant de la région C-terminale de H2A.Z jusqu'à l'histone H2B (Suto *et al.*, 2000). On pense que cette surface acide sur les nucléosomes contenant H2A.Z servirait de plateforme de recrutement pour des protéines nucléaires. Entre autres, cette surface acide est requise pour promouvoir le repliement et la formation de structures secondaires de la chromatine chez les eucaryotes supérieurs (Fan *et al.*, 2004). Également, des mutations spécifiques dans cette surface acide entraînent une sensibilité aux stress génotoxiques (Jensen *et al.*, 2011), suggérant une altération des interactions de H2A.Z avec des protéines impliquées dans la réponse aux stress ou dans la réparation des dommages à l'ADN. Cette surface acide de H2A.Z pourrait jouer le rôle d'une région d'activation de la transcription en recrutant des coactivateurs de la transcription, mais seulement lorsque H2A.Z est incorporé dans un nucléosome et que la surface acide est formée. Il a été démontré que le remplacement de la région C-terminale de H2A.Z par la région correspondante de H2A chez *Drosophila melanogaster* est létal pour l'embryon, révélant que la fonction spéciale de H2A.Z, par rapport à H2A, réside dans sa région C-terminale (Clarkson *et al.*, 1999). Une fusion semblable à celle chez *D. melanogaster* a été réalisée chez *S. cerevisiae*; la région C-terminale de H2A.Z a été remplacée par la région correspondante de H2A pour obtenir la fusion ZA (Adam *et al.*, 2001). De manière intéressante, les résultats démontrent que la fusion ZA est assemblée de façon appropriée dans les nucléosomes, mais ne procure pas la fonction spéciale de H2A.Z dans l'induction de la transcription. Par la suite, Larochelle et Gaudreau (2003) ont ajouté une région d'activation de la

transcription acide provenant de l'activateur Gal4p (nommée rII') à la fusion ZA. Leur hypothèse était qu'une région d'activation de la transcription acide pourrait mimer les interactions des complexes remodeleurs de la chromatine et des facteurs de transcription avec la nucléosome contenant H2A.Z possédant une surface d'interaction acide. En effet, les résultats démontrent que la région acide d'activation de la transcription fusionnée à la construction ZA permet de restaurer la fonction spéciale de H2A.Z dans l'induction des gènes *GAL*. Ainsi, ils ont démontré que la région C-terminale de H2A.Z remplit une fonction rappelant celle d'une région d'activation de la transcription (Larochelle et Gaudreau, 2003).

Chez *S. cerevisiae*, des résultats obtenus par co-immunoprécipitation ont démontré que H2A.Z interagit avec l'ARNpolIII de manière directe ou indirecte *in vitro*, mais n'interagit pas significativement avec la protéine liant la boîte TATA (TBP). Il semble improbable que la cible directe de H2A.Z soit l'ARNpolIII, mais plutôt une protéine associée à l'ARNpolIII pouvant lier l'ADN (Adam *et al.*, 2001). Aussi, un défaut de recrutement des complexes Médiateur, SAGA et Swi/Snf au promoteur du gène *GAL1* est observé lorsque H2A.Z est absent (Lemieux *et al.*, 2004). Ainsi, on pense que le positionnement incorrect des nucléosomes flanquant la région NFR chez la levure est suffisant pour diminuer le recrutement de la machinerie de la transcription au promoteur. Chez les cellules de mammifères, il a été démontré que H2A.Z est nécessaire pour le recrutement et l'association transitoire de facteurs de transcription pionniers aux promoteurs tels que Foxa2, un facteur de transcription clé dans le développement et l'activation de la transcription, et CLOCK et BMAL1, des facteurs régulant l'expression de gènes suivant un rythme circadien (Li *et al.*, 2012 et Mohawk *et al.*, 2012). Chez les mammifères, l'association de H2A.Z aux promoteurs précède et favorise le recrutement de l'ARN polymérase II et mène ainsi à l'activation de la transcription ou à la préparation du promoteur pour une activation subséquente, selon le contexte (Hardy *et al.*, 2009). Par

exemple, H2A.Z est recruté au promoteur du gène *IL8* suite à un traitement des cellules par la daunorubicine, un agent chimiothérapeutique qui s'intercale dans l'ADN et inhibe la progression de la topoisomérase II dans la transcription. Au promoteur du gène inductible *IL8*, le recrutement de l'ARN polymérase et l'activation de la transcription sont dépendants du recrutement antérieur de H2A.Z.

Plusieurs études chez les mammifères ont démontré que H2A.Z est nécessaire via son implication dans le silençage des gènes. Pendant le développement précoce chez la souris, H2A.Z est principalement localisé dans l'hétérochromatine péricentrique et interagit avec la protéine HP1- α et INCENP, essentielles pour la ségrégation des chromosomes. Il a été démontré que les protéines HP1- α et INCENP colocalisent et interagissent directement avec H2A.Z. De plus, la protéine HP1- α interagit directement avec la région C-terminale de H2A.Z et crée une région de chromatine hautement condensée (Fan *et al.*, 2004 et Rangasamy *et al.*, 2003). L'inactivation de H2A.Z par un ARN interférent entraîne une mauvaise localisation de HP1- α et un défaut de ségrégation des chromosomes (Rangasamy *et al.*, 2004). HP1- α et H2A.Z pourraient coopérer afin d'établir des régions hétérochromatiques spécifiques et réguler de manière négative la transcription de certains gènes (Fan *et al.*, 2004). De plus, le variant d'histone H2Av, l'homologue de H2A.Z chez *D. melanogaster*, est essentiel pour le recrutement de la protéine HP1- α pendant la formation de l'hétérochromatine centromérique (Swaminathan *et al.*, 2005).

Il semble évident que H2A.Z est nécessaire pour le recrutement de certaines protéines nucléaires clés pour la régulation de la transcription, mais les interactions directes avec

H2A.Z et plus précisément avec la surface acide du nucléosome contenant H2A.Z, n'ont pas encore été confirmées.

1.3.3.3 Évincement de H2A.Z de la chromatine suite à l'induction de la transcription

Bien que la majeure partie de l'assemblage des nucléosomes survient pendant la réplication de l'ADN en phase S, les nucléosomes sont assemblés et désassemblés régulièrement pendant le cycle cellulaire afin de rendre l'ADN accessible et permettre certains processus (Avvakumov *et al.*, 2011 et Burgess et Zhang, 2013). Des éléments régulateurs, tels que les promoteurs et les origines de réplication, sont trouvés dans des régions dépourvues de nucléosomes (Eaton *et al.*, 2010 et Yuan *et al.*, 2005). Afin d'induire la transcription génique, les facteurs de transcription et l'ARNpolIII s'assemblent sur la région dépourvue de nucléosomes où l'ADN est accessible et forment le complexe de préinitiation de la transcription (Rhee et Pugh, 2012). Le nucléosome immédiatement en amont de la région NFR est appelé le nucléosome +1 (Albert *et al.*, 2007) et puisque le ce nucléosome cache le TSS de la plupart des gènes chez la levure, il est escompté que le nucléosome +1 soit désassemblé à un certain point pendant le processus d'activation de la transcription afin de permettre la progression de l'ARNpolIII. Ce remodelage implique un évincement des histones en amont de l'ARNpolIII et une réincorporation des histones suite au passage de l'enzyme afin de reformer la structure de la chromatine. En ce qui concerne les promoteurs où le nucléosome +1 cache la boîte TATA ou les promoteurs présentant un nucléosome fragile à l'intérieur de la région NFR, on suppose que l'évincement des histones précède et régule l'assemblage du complexe de préinitiation de la transcription (Kubik *et al.*, 2015 et Rhee et Pugh, 2012). Chez les métazoaires, le nucléosome +1 se trouve en aval du TSS (Schones *et al.*, 2008) et constitue une barrière à

l'élongation (Weber *et al.*, 2014). Les nucléosomes +1 sont enrichis pour le variant d'histone H2A.Z (Raisner *et al.*, 2005) et forment des nucléosomes moins stables avec le variant H3.3 (Jin et Felsenfeld, 2007 et Zhang *et al.*, 2005). Il a été démontré que l'association de H2A.Z aux promoteurs et dans les régions transcrites est perdue graduellement suite à l'induction de la transcription (Santisteban *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 2001; Larochelle et Gaudreau, 2003; Guillemette *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005 et Hardy *et al.*, 2009). H2A.Z est évincé de la chromatine pendant l'activation de la transcription de plusieurs gènes chez la levure (Santisteban *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 2001; Larochelle et Gaudreau, 2003 et Zhang *et al.*, 2005) et chez les mammifères (Farris *et al.*, 2005).

Le mécanisme par lequel H2A.Z est évincé de la chromatine est encore incertain, il n'est pas confirmé si seul H2A.Z, le dimère H2A.Z/H2B ou l'octamère d'histones au complet est évincé. Il a été démontré que l'élongation de la transcription perturbe la structure de la chromatine et que le complexe d'élongation peut distinguer les histones canoniques des variants d'histones. En effet, l'élongation permettrait d'évincer les dimères contenant H2A et les dimères contenant H2A.Z, mais un mécanisme couplé à la transcription permettrait de prévenir la réassociation des dimères contenant H2A.Z au passage de l'ARN polymérase II (Hardy *et al.*, 2009). Un enrichissement de H2A.Z est observé dans les promoteurs, mais H2A.Z est également incorporé de manière aléatoire et à faible niveau dans le corps des gènes. La présence de H2A.Z dans le corps des gènes a également été observée dans les plantes et dans les lymphomes B chez la souris (Coleman-Derr et Zilberman, 2012; Conerly *et al.*, 2010 et Zilberman *et al.*, 2008). De manière similaire aux promoteurs, les variants H2A.Z se trouvant dans les régions codantes sont évincés dans les minutes qui suivent l'induction de la transcription dans la levure et dans les cellules de mammifères (Hardy *et al.*, 2009 et Hardy et Robert, 2010). De plus, une accumulation de H2A.Z dans le corps des gènes est observée lorsque la transcription est réduite, suggérant que l'incorporation et l'évincement de H2A.Z couplés

à la transcription sont nécessaires pour l'organisation d'une structure chromatinienne spéciale par H2A.Z (Hardy et Robert, 2010).

Le mécanisme par lequel le complexe d'élongation distingue les dimères contenant H2A ou H2A.Z n'est pas clair, mais les diverses chaperonnes d'histones semblent impliquées dans ce mécanisme puisqu'elles interagissent avec le complexe d'élongation de la transcription. Plusieurs chaperonnes d'histones peuvent faciliter l'assemblage ou le désassemblage des nucléosomes pendant la transcription. Par exemple, le complexe FACT (facilitates chromatin transcription) et la protéine Spt6, possèdent tous les deux des activités de chaperonnes d'histones *in vitro* (Belotserkovskaya *et al.*, 2003 et Bortvin et Winston, 1996) et sont nécessaires dans l'organisation adéquate de la structure chromatinienne (Bortvin et Winston, 1996; DeGennaro *et al.*, 2013; Ivanovska *et al.*, 2011; Jamaï *et al.*, 2009; Kaplan *et al.*, 2003; Schwabish et Struhl, 2004 et Voth *et al.*, 2014). La sous-unité Spt16 du complexe FACT et la protéine Spt6 sont impliquées dans l'élongation transcriptionnelle (Hartzog *et al.*, 1998; Kaplan *et al.*, 2000 et Orphanides *et al.*, 1998). Bien que ces études aient été menées dans la levure, il existe des protéines orthologues aux chaperonnes FACT et Spt6 chez plusieurs eucaryotes, dont l'humain. De manière intéressante, la chaperonne humaine FACT peut également distinguer les histones H2A.Z et H2A *in vitro* (Heo *et al.*, 2008). Aussi, la protéine humaine, ANP32E, une composante du complexe de remodelage de la chromatine TIP60, est impliquée dans l'évincement spécifique de H2A.Z des sites d'initiation de la transcription et des régions régulatrices (Mao *et al.*, 2014 et Obri *et al.*, 2014). La chaperonne FACT peut distinguer les histones H2A.Z et H2A (Heo *et al.*, 2008 et Jeronimo *et al.*, 2015), mais ne peut pas distinguer H2A.X de H2A (Heo *et al.*, 2008), suggérant que ce complexe joue un rôle précis dans la prévention de l'incorporation de H2A.Z ailleurs que dans le promoteur. En effet, le complexe SWR1 est recruté dans le corps des gènes dans des mutants FACT et Spt6, incorporant le variant H2A.Z de façon excessive dans le corps des gènes. De plus,

ces protéines présentent une préférence de liaison pour H2A, ce qui pourrait expliquer la prévention de la réassociation de H2A.Z avec la chromatine (Hardy *et al.*, 2009). Il a été démontré que le complexe FACT et la protéine Spt6 incorporent H2A dans le corps du gène suite au passage de l'ARN polymérase et empêchent ainsi la perte de nucléosomes. Ces protéines limitent l'association de H2A.Z dans le corps des gènes, car une perte de nucléosomes peut mener au recrutement du complexe SWR1 dans le corps des gènes, à une mauvaise incorporation de H2A.Z et à l'initiation de la transcription cryptique en ces sites (Figure 1.11). En effet, lorsque le complexe FACT ou la protéine Spt6 sont perdus, un défaut de réincorporation de H2A et une mauvaise incorporation de H2A.Z dans les régions transcrites sont observés et favorisent une initiation cryptique de la transcription dans le corps des gènes (Jeronimo *et al.*, 2015). Ainsi, les chaperonnes FACT et Spt6 sont nécessaires afin de prévenir une mauvaise incorporation de H2A.Z dans le corps des gènes et d'éviter l'initiation cryptique de la transcription (Jeronimo *et al.*, 2015). Puisqu'un dérèglement des fonctions de H2A.Z est impliqué dans le développement du cancer (Dryhurst et Ausio, 2014; Monteiro *et al.*, 2014 et Rangasamy, 2010), on suppose que l'initiation de la transcription cryptique par H2A.Z pourrait contribuer à la carcinogenèse (Jeronimo *et al.*, 2015). En effet, des niveaux élevés de H2A.Z sont associés à un pronostic négatif dans la progression cancéreuse (Dryhurst et Ausio, 2014; Monteiro *et al.*, 2014 et Rangasamy, 2010). Aussi, il a été démontré que la chaperonne FACT agit comme un accélérateur dans la formation de tumeurs (Garcia *et al.*, 2013). Une transcription anormale est une marque des cellules cancéreuses et l'initiation de la transcription cryptique par H2A.Z pourrait être impliquée dans le changement des patrons d'expression génique.

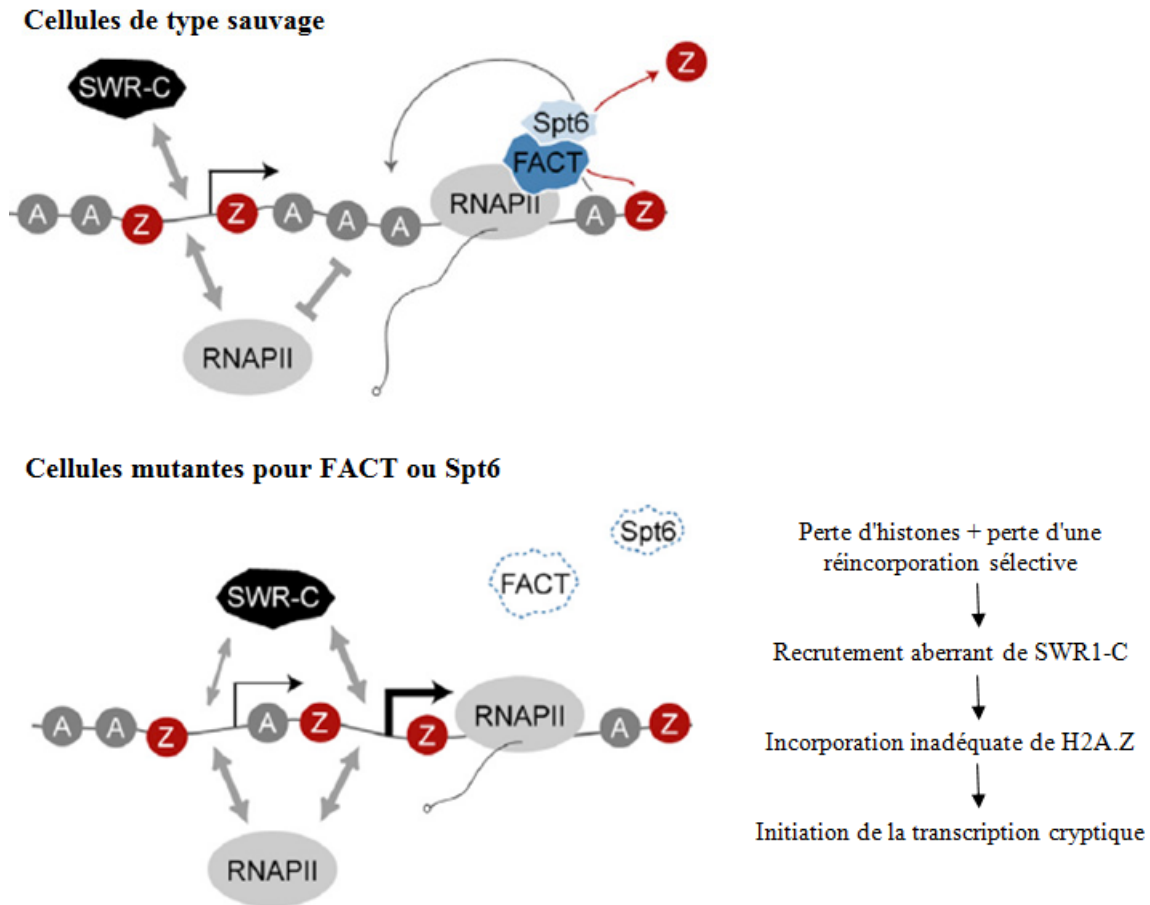


Figure 1.13 Modèle schématique décrivant les activités de FACT et Spt6 dans le maintien de l'état épigénétique et dans la protection contre l'initiation de la transcription cryptique. Normalement, les protéines FACT et Spt6 préviennent la perte d'histones et réincorporent spécifiquement H2A dans le corps des gènes pendant l'élongation transcriptionnelle. Ces protéines assurent une structure de la chromatine adéquate et préviennent l'initiation de la transcription cryptique (haut). Lorsque FACT ou Spt6 est muté et que leur fonction est compromise, une perte d'histones est observée et H2A.Z n'est pas évincé de la chromatine de manière appropriée. Le manque de nucléosome dans le corps des gènes mène au recrutement aberrant du complexe SWR1, qui incorpore davantage H2A.Z dans la chromatine menant à une accumulation de H2A.Z. La structure de la chromatine, pauvre en nucléosome et enrichi en H2A.Z, promouvoit l'initiation de la transcription cryptique (bas) (Figure tirée et adaptée de Jeronimo *et al.*, 2015).

Chez *S. cerevisiae*, le complexe remodeleur de la chromatine ATP-dépendant INO80 est responsable de l'évincement de H2A.Z de la chromatine (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2011). En effet, ce complexe fait partie de la famille SWI/SNF et il catalyserait la réaction inverse au complexe SWR1, soit l'échange d'un dimère H2A.Z/H2B pour un dimère H2A/H2B. Le complexe INO80 a d'abord été caractérisé chez la levure et comporte 12 sous-unités (Shen *et al.*, 2000). Sa sous-unité catalytique, Ino80, possède un domaine ATPase et est impliquée dans le remodelage de la chromatine de manière ATP-dépendante (Shen *et al.*, 2000). Des expériences *in vitro* ont démontré que INO80 permet le glissement de nucléosomes dans la chromatine et faciliterait la transcription en arrangeant les nucléosomes du promoteur selon un patron spécifique (Shen *et al.*, 2000 et Shen *et al.*, 2003). Il a été démontré que INO80 est recruté au promoteur du gène *INO1* immédiatement après l'induction de sa transcription, en association avec le complexe remodeleur de la chromatine SWI/SNF et le complexe modificateur d'histone SAGA. Lorsque la transcription est induite, les nucléosomes doivent être remodelés afin de permettre la progression de l'ARNpolIII. Le complexe INO80 serait impliqué dans ce remodelage en évincant les histones en amont de l'ARNpolIII, incluant le variant H2A.Z. Une fois la transcription du gène induite, l'évincement des nucléosomes du promoteur est essentiel pour une activation complète de la transcription (Barbaric *et al.*, 2007). Un mutant de délétion pour le gène *ARP5*, codant la sous-unité Arp5 du complexe INO80, entraîne une accumulation globale de H2A.Z spécifiquement autour des promoteurs (Yen *et al.*, 2013). Par contre, Jeronimo *et al.* (2015) observent une localisation similaire de H2A.Z à l'échelle du génome pour une souche mutante *ino80Δ* et la souche de type sauvage. Ainsi, on pense que le complexe INO80 pourrait contribuer à l'évincement de H2A.Z de la chromatine au niveau du promoteur, mais il n'est pas exclu que d'autres facteurs ou complexes soient impliqués également.

Plus récemment, il a été suggéré que la machinerie de transcription pouvait jouer un rôle dans le désassemblage du nucléosome +1 contenant H2A.Z (Tramantano *et al.*, 2016). Afin de comprendre la contribution de la machinerie de transcription au désassemblage du nucléosome +1 contenant H2A.Z, cette équipe a utilisé des mutants conditionnels afin de bloquer l'assemblage du complexe de préinitiation de la transcription (PIC). À l'aide de la méthode de co-immunoprécipitation de la chromatine couplée au séquençage à haut débit (ChIP-seq), ils ont détecté et mesuré les changements globaux dans l'association de H2A.Z à la chromatine. Ainsi, ils ont démontré que le blocage de l'assemblage du PIC mène à l'accumulation de H2A.Z aux promoteurs spécifiquement, indiquant que le PIC est requis pour l'évincement de H2A.Z de la chromatine. De manière intéressante, l'évincement de H2A.Z n'était pas affecté par la déplétion du complexe INO80. Par conséquent, l'équipe d'Ed Luk propose un modèle revisité du cycle dynamique d'incorporation et d'évincement du variant d'histone H2A.Z (Figure 1.12). Premièrement, des complexes remodeleurs de la chromatine ATP-dépendants sont recrutés aux promoteurs par des facteurs liant des séquences d'ADN spécifiques afin d'établir la région dépourvue de nucléosomes (Figure 1.12, étape I). Le complexe SWR1 est recruté à la région NFR par son affinité pour des fragments d'ADN nu, ou à moindre niveau, par l'acétylation des histones du promoteur et remplace les deux dimères H2A/H2B du nucléosome +1 par des dimères H2A.Z/H2B (Figure 1.12, étape II). Le PIC est assemblé au niveau de la région NFR de manière adjacente au nucléosome +1 contenant H2A.Z (Figure 1.12, étape III). À un certain point, le PIC engage le site d'initiation de la transcription et le nucléosome +1 contenant H2A.Z est désassemblé (Figure 1.12, étape IV). Suite à la dissociation de l'ARNpolIII et des facteurs généraux de la transcription du promoteur, une réassociation de dimères H2A/H2B au niveau du nucléosome +1 est observée (Figure 1.12, étape V). Ainsi, il est proposé que les complexes remodeleurs de la chromatine en coopération avec la machinerie de transcription coordonnent les mouvements des histones au niveau du promoteur menant à une structure dynamique de la chromatine propice à la transcription.

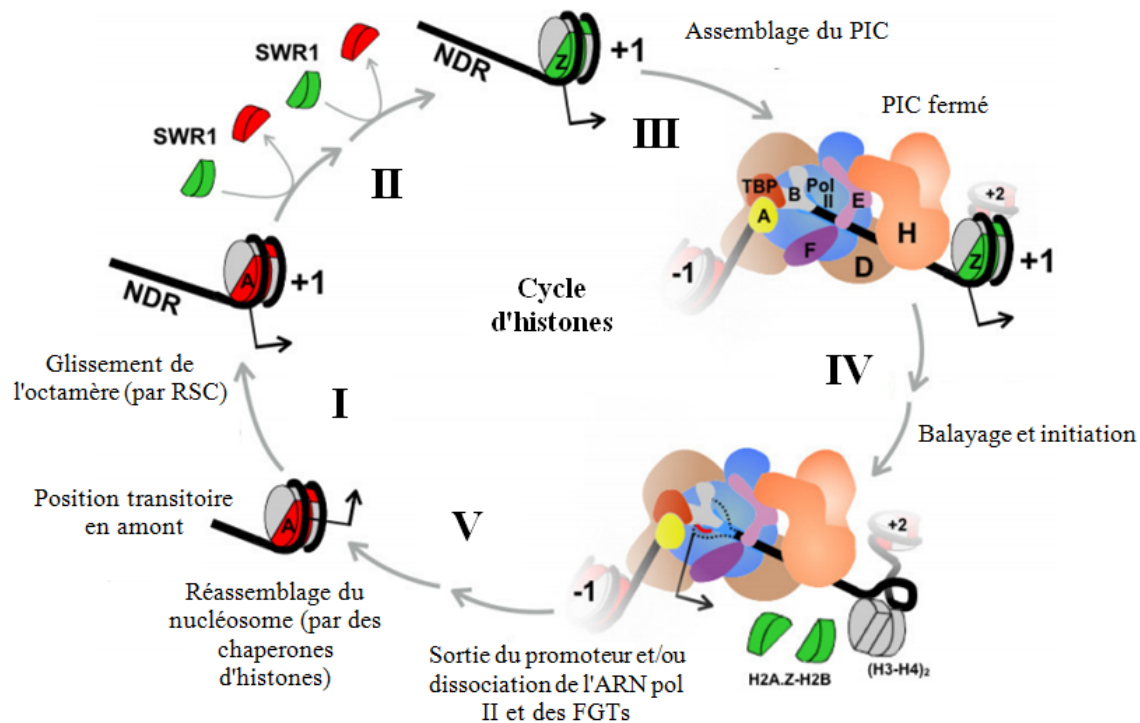


Figure 1.14 Modèle revisité du cycle d'histones. Étape I: Des complexes remodeleurs, tels que RSC, glissent les octamères d'histones afin de positionner le nucléosome +1 de manière précise. Étape II: Le complexe SWR1 est recruté à la région NFR et remplace les deux dimères H2A/H2B du nucléosome par des dimères H2A.Z/H2B. Étape III: Le PIC est assemblé à la région NFR de manière adjacente au nucléosome +1 contenant H2A.Z. Étape IV: Le PIC engage le nucléosome +1 contenant H2A.Z, qui est désassemblé, et la transcription est initiée. Étape V: un nucléosome canonique contenant H2A est réassemblé au niveau du TSS suite à la dissociation de l'ARN pol II et des FGTs du promoteur, mais ce nucléosome est positionné de manière imprécise par rapport au TSS (Figure tirée et adaptée de Tramantano *et al.*, 2016).

1.4 Description du projet de recherche

L'étude du remodelage de la chromatine et de l'implication du variant d'histone H2A.Z dans différents processus biologiques représente un des axes de recherche de notre

laboratoire. Plus spécifiquement, nous étudions depuis plusieurs années l'implication de la région C-terminale de H2A.Z dans la transcription génique chez *S. cerevisiae*. Afin d'étudier la région C-terminale de H2A.Z, diverses expériences ont été réalisées dans notre laboratoire avec des protéines dérivées de H2A.Z, dont la région C-terminale a été modifiée. La protéine de fusion ZA comporte la région N-terminale et le domaine central de H2A.Z, mais comporte la région C-terminale de H2A.Z. La protéine de fusion ZA-rII' a été créée en fusionnant un domaine acide d'activation de la transcription en C-terminal de la protéine ZA. Il a été démontré par des membres du laboratoire que l'expression de la fusion ZA procure aux cellules un phénotype similaire au mutant *htz1Δ*. De manière intéressante, l'ajout de la région d'activation rII' à ZA permet de restaurer la fonction spéciale de H2A.Z par rapport à l'induction du gène *GALI* et la résistance aux stress génotoxiques. De plus, grâce à la méthode de co-immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), ceux-ci ont démontré que ZA-rII' se comportait comme H2A.Z en ce qui concerne la distribution au niveau des régions promotrices des gènes *PHO5* et *PUR5*, c'est-à-dire un enrichissement dans la région promotrice comparativement aux régions codantes (Adam *et al.*, 2001 et Larochelle et Gaudreau, 2003).

Compte tenu des résultats antérieurs, nous avons émis l'hypothèse que la région C-terminale de H2A.Z permet des interactions spécifiques nécessaires pour sa localisation aux promoteurs et pour le contrôle de la transcription génique. Afin de vérifier cette hypothèse, mon projet de maîtrise comportait trois objectifs principaux. Mon premier objectif consistait en l'étude du rôle fonctionnel de la région C-terminale de H2A.Z dans son incorporation dans la chromatine et dans sa localisation spécifique aux promoteurs à l'échelle du génome. Pour ce faire, j'ai réalisé la méthode de co-immunoprécipitation de la chromatine couplée aux puces à ADN (ChIP-chip) afin de comparer les localisations de H2A.Z, ZA et ZA-rII' à l'échelle du génome. Mon deuxième objectif de maîtrise consistait en l'investigation du rôle de la région C-terminale de H2A.Z dans le contrôle de

la transcription génique. Pour ce faire, j'ai vérifié l'effet de la modification de la région C-terminale de H2A.Z sur l'expression globale de gènes essentiels et non essentiels impliqués dans différents processus biologiques. Pour mon troisième objectif, nous avons appliqué la méthode de protéomique BioID à la levure dans le but d'identifier les différentes protéines nucléaires pouvant interagir avec les nucléosomes contenant H2A.Z et mener à la régulation de la transcription. Les résultats obtenus pendant ma maîtrise et présentés dans ce mémoire permettent un rapprochement entre la localisation spécifique de H2A.Z aux promoteurs et son rôle dans la régulation de la transcription chez la levure. De plus, notre étude confère à la région C-terminale de H2A.Z un rôle transcriptionnel global dans la régulation de l'expression et potentiellement dans d'autres processus biologiques.

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

2.1 Souches de levures et plasmides

La souche *Saccharomyces cerevisiae* W303a haploïde a été utilisée dans cette étude et la souche mutante *htz1Δ* a été obtenue en échangeant l'allèle du gène *HTZ1* par une cassette contenant le gène de résistance à l'antibiotique CloNat. La cassette a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pFR6-NAT, a été purifiée puis transformée dans la souche W303a de type sauvage. Tous les dérivés de H2A.Z contiennent une étiquette HA insérée au site de restriction BglII du gène *HTZ1* et sont exprimés sous le contrôle du promoteur β -actine. La construction ZA a été générée en fusionnant les acides aminés 1-97 de H2A.Z à la région C-terminale d'H2A, soit les acides aminés 91-132 de H2A (Adam *et al.*, 2001). La construction ZA-rII' a été générée en ajoutant les acides aminés 840-881 de l'activateur Gal4 en C-terminal de la construction ZA. Toutes les constructions ont été intégrées au locus *URA3* endogène par linéarisation des plasmides par la digestion par EcoRV-HF puis par transformation de la souche *htz1Δ*.

2.2 Immunobuvardage de type Western

Les cellules ont été cultivées dans un milieu yeast extract-peptone contenant 2% glucose jusqu'à la phase exponentielle. 5 DO de cellules ont été récoltées par souche,

resuspendues dans de l'eau pure et lysées par l'ajout de NaOH 0,2M. Le lysat est centrifugé et la phase solide est resuspendue dans du loading buffer 2X puis bouillie à 95°C pendant 10 min afin de solubiliser les histones. 6 µL d'extraits protéiques ont été chargés sur les gels SDS-PAGE pour l'analyse des protéines. Les niveaux des protéines H2A.Z, ZA et ZA-rII' ont été détectés grâce à l'anticorps anti-HA (12CA5; Roche) et le niveau de l'histone H3 a été détecté comme contrôle de chargement des échantillons grâce à l'anticorps anti-H3 (ab1791; Abcam). Les membranes sont révélées en utilisant la trousse de détection (BioRad). Tous les anticorps utilisés dans cette étude sont disponibles dans le Tableau 2.1.

Tableau 2.1 Anticorps utilisés dans cette étude

	Manufacturier	Numéro de catalogue	Applications
HA tag	Roche	12CA5	WB et ChIP
His tag	Sigma	SAB1306085	WB
Histone H3	Abcam	ab1791	WB et ChIP

2.3 Essais phénotypiques

Un test de croissance est effectué pour déterminer le phénotype de sensibilité aux dommages à l'ADN, causés ici par différents agents génotoxiques incluant l'hydroxyurée (HU) 100 mM, la caféine 3 mM et le méthyl méthanesulfonate (MMS) 0,02%. Les cellules ont été cultivées dans un milieu yeast extract-peptone contenant 2% glucose jusqu'à une DO600nm de 0,8-1,0. Les cellules sont récoltées, lavées à trois reprises dans

l'eau stérile et diluées à 1 DO/mL. Des séries de dilutions 1/10 de la suspension cellulaire sont réalisées et les échantillons sont appliqués sur les boîtes de pétris contenant les milieux supplémentés en agents génotoxiques. Les boîtes de pétris sont incubées à 30°C pendant 2 à 5 jours.

2.4 Essais d'expression par transcription inverse et PCR quantitative (qRT-PCR)

Les cellules ont été cultivées dans un milieu yeast extract-peptone contenant 2% glucose jusqu'à une DO_{600nm} de 0,6-0,8. Pour l'essai d'induction de la transcription du gène *GALI*, les cellules ont été cultivées jusqu'à une DO_{600nm} de 0,5-0,6 dans un milieu yeast extract-peptone contenant 2% raffinose puis du galactose a été ajouté dans le milieu à une concentration finale de 2% pendant 1 heure afin d'induire la transcription du gène *GALI*. Préalablement à l'induction, 10 DO de cellules ont été récoltées pour le contrôle non induit (*repressed*) et 10 DO de cellules ont été récoltées 60 minutes suite à l'induction de *GALI* (condition induite). Pour tous les essais d'expression, 10 DO de cellules ont été récoltées, centrifugées puis congelées à -80°C jusqu'à l'extraction d'ARN total. Suite à l'extraction de l'ARN, le dosage des ARN est effectué avec le nanodrop 1000, les ARN sont dilués et l'ADN est éliminé par un traitement à la DNase (Invitrogen). Ensuite, la transcription inverse a été effectuée sur 2 µg d'ARN avec l'enzyme MMuLV Reverse Transcriptase (Enzymatics) et des oligonucléotides aléatoires. L'ADNc a été analysé en utilisant les oligonucléotides appropriés et l'agent intercalant Brilliant SYBR Green. Les niveaux d'ARNm pour les gènes d'intérêt ont été normalisés sur le niveau d'ARNm du gène constitutif *ACT1*. Pour l'essai d'expression des gènes associés à H2A.Z, ZA et ZA-rII', les niveaux d'ARNm normalisés ont été rapportés par rapport au niveau d'expression de H2A.Z. Les échantillons ont été analysés en triplicata et les expériences de qRT-PCR ont été performées en duplicata.

2.5 Co-immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Les expériences de co-immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont été réalisées en duplicata telles que décrites précédemment (Adam *et al.*, 2001 et Guillemette *et al.*, 2005) avec quelques modifications. Brièvement, 50 mL de cellules ont été cultivés dans un milieu yeast extract-peptone contenant 2% glucose jusqu'à une DO_{600nm} de 0,6 et fixées dans du formaldéhyde à une concentration finale de 1% pendant 10 min. Le formaldéhyde a été neutralisé par l'ajout de glycine 2,5M. 350 µL d'échantillons d'extraction totale de la cellule (whole-cell extract) ont été incubés avec l'anticorps anti-HA (12CA5; Roche) ou anti-H3 (ab1791; Abcam) couplés à des billes magnétiques (Dyna) pendant une nuit, à 4°C et avec agitation. L'ADN immunoprécipité a été utilisé pour des analyses de localisation à l'échelle du génome (voir section 2.7 des matériels et méthodes) ou pour des analyses par PCR quantitative. Pour les analyses de ChIP-qPCR, 2 µL de l'ADN immunoprécipité ont été mélangés avec les oligonucléotides appropriés et l'agent intercalant Brilliant SYBR Green. Les signaux de qPCR ont été normalisés par rapport à 1% de l'ADN total. Toutes les expériences ont été réalisées au moins deux fois et produisent des résultats similaires.

2.6 Co-immunoprécipitation de la chromatine couplées aux puces à ADN (ChIP-chip)

Marquage de l'ADN et hybridation

La localisation de H2A.Z, ZA et ZA-rII' à l'échelle du génome a été déterminée par ChIP-chip tel que décrit précédemment (Guillemette et al., 2005 et Jeronimo et Robert, 2017). Brièvement, l'ADN immunoprécipité est clivé pour obtenir des bouts francs et amplifié par LM-PCR (*ligation-mediated PCR*) afin d'ajouter de courts oligonucléotides unidirectionnels d'ADN double-brin, appelés « linkers ». La réaction d'amplification par PCR est réalisée en présence de dUTP modifiés qui seront incorporés dans le produit d'amplification. L'ADN amplifié est marqué à l'aide de molécules fluorescentes. Des esters NHS monoréactifs fluorescents (Cy-dyes) sont utilisés pour le marquage fluorescent puisqu'ils réagissent de manière spécifique avec les dUTP modifiés. Les échantillons tests et les échantillons contrôles sont marqués par différentes molécules fluorescentes (normalement Cy5 et Cy3). Les échantillons tests représentent les co-immunoprécipitations de la chromatine avec les protéines d'intérêt H2A.Z, ZA ou ZA-rII'. Comme contrôle, nous avons performé des co-immunoprécipitations de la chromatine avec l'histone H3 en parallèle pour chacun des duplicata afin de pouvoir normaliser les données par rapport à la densité nucléosomale. Également, afin d'obtenir une deuxième méthode de normalisation, nous avons réalisé une hybridation des ChIP pour H2A.Z, ZA et ZA-rII' en compétition avec 1% de l'ADN immunoprécipité (nommée « 1% input DNA »). Les échantillons tests et contrôles sont combinés et co-hybridés sur la puce à ADN. Les fragments d'ADN marqués compétitionnent pour la liaison des sondes sur la puce et le rapport d'intensité de fluorescence résultant reflète l'abondance relative des deux échantillons marqués.

Puces à ADN et analyse des données de ChIP-chip

Les puces utilisées proviennent de Agilent technologies (Palo Alto, California, États-Unis) et contiennent un total de 180,000 sondes dont le T_m est ajusté et couvrant l'entièreté du génome de la levure avec pratiquement pas d'espaces entre les sondes. La lecture des puces à ADN a été réalisée avec l'appareil de lecture Innoscan900 et le logiciel Mapix. Les données ont été normalisées par la technique globale Lima Loess et les duplicata ont été combinés en utilisant une méthode de pondération de la moyenne (Ren *et al.*, 2000). Les données brutes sont obtenues dans un format BED et représentent un ratio en log₂. Un filtre gaussien a été appliqué aux données brutes (en format BEDs) afin de créer une courbe lisse (en format SmoothBEDs) de l'association des protéines d'intérêt à l'échelle du génome.

2.7 Développement et optimisation d'un protocole pour l'application de la méthode BioID chez la levure

*Mutation de BirA et construction des fusions avec l'enzyme BirA**

Le plasmide pVTU_260_BirA (Rodgers *et al.*, 2015) encode le gène de la biotine ligase provenant de *E. coli* (BirA) optimisé pour l'expression chez la levure. BirA possède une étiquette 6x histidine (6xHIS) dans sa région N-terminale et est exprimée à partir du promoteur constitutif ADH1. La version « promiscuous » BirA* porte la mutation R118G où l'arginine (codon CGC) en position 118 a été échangée pour une glycine (codon GGT) par mutagenèse dirigée. Brièvement, des oligonucléotides se chevauchant et comportant le codon désiré (GGT codant pour une glycine) ont été utilisés afin d'amplifier le plasmide pVTU_260_BirA et ainsi introduire la mutation R118G. Les plasmides

pVTU_260_BirA utilisés comme gabarit sont ensuite digérés par l'enzyme DpnI qui reconnaît seulement les sites méthylés. Les plasmides restants, comportant la mutation R118G, sont transformés dans des bactéries XL1-gold supercompétentes. Les plasmides sélectionnés (nommés pBirA*) ont été vérifiés par séquençage. Une deuxième mutagenèse dirigée a été réalisée afin d'enlever le codon STOP du gène BirA* (plasmide nommé pBirA*delSTOP) afin de créer une protéine de fusion entre l'enzyme BirA* et nos gènes d'intérêt. Les plasmides codant la protéine de type sauvage, nommée BirA-WT, ainsi que la version « promiscuous » BirA* (possédant toujours son codon STOP) ont été linéarisés par digestion et intégrés dans le génome d'une souche mutante *htz1Δ* au locus *URA3*.

La version « promiscuous » BirA* (pBirA*delSTOP) a été utilisée afin de créer les protéines de fusion entre l'enzyme BirA* et H2A.Z, la région C-terminale de H2A.Z (Z(98-134)) ou le contrôle EGFP par assemblage de Gibson. Le vecteur pBirA*delSTOP a été linéarisé par digestion par l'enzyme de restriction BamHI-HF. Les inserts ont été amplifiés par PCR avec des oligonucléotides comportant 20 nucléotides chevauchant les régions désirées du plasmide pBirA*delSTOP. Grâce aux homologies de séquences, les inserts ont été introduits à la suite du gène BirA* par assemblage de Gibson. L'enzyme BirA* est placée en N-terminale de nos protéines d'intérêt. La réaction de Gibson est directement transformée dans des bactéries MM294 et les plasmides résultants ont été séquencés puis nommés BirA*H2A.Z, BirA*Z(98-134) et BirA*EGFP. Ces plasmides ont été intégrés dans le génome d'une souche mutant *htz1Δ* au locus *URA3*.

Immunobuvardage de type Western

Pour la méthode BioID, les niveaux des enzymes BirA et BirA* et les niveaux des protéines de fusions avec BirA* ont été détectés par immunobuvardage de type Western tel que décrit à la Section 2.2, mais en utilisant l'anticorps anti-HIS (Sigma). Les niveaux de protéines biotinylées ont été détectés de manière similaire avec quelques modifications. Les membranes ont été bloquées dans une solution de sérum albumine bovine 1% dans du TBS supplémenté de 0,1% Triton X-100. Les protéines biotinylées sont détectées par l'incubation avec la streptavidine couplée à la peroxydase Horseradish (1:5,000; GE Healthcare Life Sciences) pendant la nuit, à 4°C, dans le même tampon. Les membranes sont lavées puis révélées en utilisant la trousse de détection (BioRad).

Cultures et induction de la biotinylation pour la méthode BioID

Les cellules sont cultivées dans un milieu yeast extract-peptone contenant 2% glucose à 30°C pendant une nuit et ensuite les cultures sont diluées à une densité optique de 0,2. La biotine libre est ajoutée aux cultures à une concentration finale de 50 ou 100 μ M. Les cultures sont incubées pour différents temps, selon les expériences et diluées progressivement pour que les cellules restent en phase exponentielle (DO600nm entre 0,3 et 1,2). 30 DO de cellules sont récoltées, centrifugées et les culots sont congelés à -80°C jusqu'à l'extraction des protéines totales.

Extraction des protéines totales de la levure

Les cellules sont lysées mécaniquement dans un tampon de lyse dénaturant (50 mM HEPES KOH pH7,5, 140 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% Na-Deoxycholate, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF et 1X mix d'inhibiteurs de protéases) à l'aide de billes de verre, pendant 2h à 4°C. Suite à la sonication des extraits cellulaires bruts, les

échantillons sont centrifugés 10 minutes, 13 000 RPM, à 4°C et les surnageants sont traités avec la DNase I (10 U/mL) et la RNase A (50 µg/mL) pendant 3 heures à 4°C. La concentration en protéines est dosée à l'aide d'une coloration de Bradford. Pour l'analyse des protéines biotinylées par immunobuvardage de type Western, des dilutions des échantillons à une concentration finale de 1 µg/µL ont été réalisées et 5 µg des extraits protéiques sont chargés dans les gels SDS-PAGE.

Purification des protéines biotinylées par affinité pour la streptavidine

Pour chaque échantillon traité à la DNase et RNase, un total de 2 mg de protéines sont récoltés, ajoutés à 20 µL de billes couplées à la streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance de GE Healthcare Life Sciences) et incubés pendant 2 heures, à 4°C, avec agitation. Les billes sont préalablement lavées à trois reprises dans du Tris 50 mM pH7,5. Ensuite, les billes sont récoltées et lavées pour 3 minutes, à 25°C (toutes les étapes subséquentes sont réalisées à 25°C) à 2 reprises dans du tampon de lavage 1 (2% SDS), à 1 reprise dans du tampon de lavage 2 (0,1% Na-Deoxycholate, 1% Triton X-100, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA et 50 mM Tris-HCl pH7,5), à 1 reprise dans du tampon de lavage 3 (250 mM LiCl, 0,5% NP-40, 0,5% Na-Deoxycholate, 1 mM EDTA et 10 mM Tris pH8,0) et à 2 reprises dans du tampon de lavage 4 (50 mM Tris-HCl pH 7,5 et 50 mM NaCl). Pour l'analyse des protéines biotinylées purifiées par immunobuvardage de type Western, les protéines liées aux billes ont été éluées dans du tampon SDS pour analyse Western supplémenté par 10 mM de biotine libre et les échantillons sont incubés pendant 10 minutes, à 95°C.

CHAPITRE 3

The H2A.Z C-terminal docking domain couples gene promoter dynamics and transcriptional outcome in yeast

Description de l'article et contribution

Plusieurs études ont démontré que la région C-terminale de H2A.Z est requise pour sa fonction unique, mais la nécessité du domaine d'amarrage de H2A.Z n'a pas été étudiée de manière approfondie en ce qui concerne la localisation génomique du variant ainsi que son rôle global dans la régulation de la transcription. À partir des études précédentes sur H2A.Z, nous avons émis l'hypothèse que le domaine d'amarrage en région C-terminale de H2A.Z est nécessaire afin de médier des interactions spécifiques menant à sa localisation précise au niveau du nucléosome +1 ainsi que mener au contrôle de la transcription génique. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé des protéines de fusion dérivées de H2A.Z exprimées dans l'organisme modèle *Saccharomyces cerevisiae*. Les versions de H2A.Z, dont la région C-terminale est modifiée, comprennent la protéine de fusion ZA, qui possède la région C-terminale de H2A, et la protéine de fusion ZA-rII', qui possède une région acide d'activation de la transcription fusionnée en C-terminal de la protéine ZA (Adam *et al.*, 2001 et Larochelle et Gaudreau, 2003). Une étude de notre laboratoire a suggéré que la région C-terminale de H2A.Z possède une fonction rappelant celle d'une région d'activation de la transcription et qu'elle médierait des interactions

semblables à la région acide d'activation de la transcription rII" (Larochelle et Gaudreau, 2003).

En comparant les distributions de H2A.Z et des protéines de fusion à l'échelle du génome, nous avons démontré que la localisation de H2A.Z au niveau des promoteurs est dépendante de sa région C-terminale, puisqu'on observe une diminution de l'incorporation de la protéine ZA au niveau du site d'initiation de la transcription à l'échelle du génome comparativement à H2A.Z. Nous avons également démontré que la perte de la version modifiée de H2A.Z de la chromatine est indépendante de sa liaison au complexe SWR1. Nous avons identifié 2240 gènes associés à H2A.Z, c'est-à-dire des gènes présentant un enrichissement de plus de deux fois H2A.Z ($\log_2 \text{ratio} \geq 1$) au niveau du promoteur, 1128 gènes associés à ZA-rII' et 370 gènes associés à ZA. Nous avons observé que les gènes associés à H2A.Z sont impliqués dans plusieurs processus biologiques et quelques-uns de ces processus sont conservés pour les gènes associés à ZA-rII', mais la plupart des processus sont perdus pour les gènes associés à ZA. De manière intéressante, nous avons démontré que l'expression de gènes non essentiels et essentiels impliqués dans les processus enrichis pour les gènes associés à H2A.Z sont dérégulés lorsque la région C-terminale de H2A.Z est modifiée. Ainsi, nous proposons que le rôle de la région C-terminale de H2A.Z dans la régulation de la transcription englobe à la fois une réorganisation locale de la structure de la chromatine ainsi que l'interaction avec des protéines effectrices menant au contrôle de la transcription génique. Cette étude permet de faire un rapprochement entre la localisation spécifique de H2A.Z aux promoteurs et son implication dans la régulation de la transcription et pour la première fois, nos résultats mettent en évidence un potentiel rôle transcriptionnel global pour la région C-terminal de H2A.Z.

Pour ce qui est de la contribution à l'article, les clonages des constructions des protéines de fusion ZA et ZA-rII' ont été réalisés dans notre laboratoire tel que décrit précédemment (Adam *et al.*, 2001 et Larochelle et Gaudreau, 2003) et utilisées dans cette étude sans modification. J'ai réalisé l'entièreté des expériences dont les résultats sont présentés dans cet article et j'ai réalisé les analyses bio-informatiques. J'ai rédigé l'entièreté de la première version du manuscrit qui a ensuite été révisé par mon directeur de recherche, Luc Gaudreau.

The Histone Variant H2A.Z C-terminal Docking Domain Couples Gene Promoter Dynamics and Transcriptional Outcome in Yeast

Hannah Neumann, and Luc Gaudreau*

Département de Biologie, Université de Sherbrooke, 2500 boul. de l'Université,
Sherbrooke, QC J1K 2R1, Canada.,

* Author to whom correspondence should be addressed: E-Mail:
Luc.Gaudreau@usherbrooke.ca

Key words: H2A.Z, Acid patch, Genomic localization, Transcription, Yeast

ABSTRACT

The replacement of the canonical histone H2A by the histone variant H2A.Z within chromatin creates local specialized chromatin domains which can be permissive to transcription. H2A.Z is preferentially found in the nucleosomes flanking the nucleosome-free region of promoters and has a role in positive and negative regulation of gene transcription in yeast. The special function of H2A.Z resides in its C-terminal docking domain which contains an acidic residue extension that continues onto histone H2B in the nucleosome. Although the H2A.Z C-terminal region is required for H2A.Z functions, the involvement of its C-terminal region in genome-wide localization and regulation of gene expression has not been extensively studied yet. Using H2A.Z C-terminal derivatives, we show that the replacement of H2A.Z C-terminal docking domain by the corresponding region of H2A, named ZA fusion protein, did not support regular H2A.Z functions, such as resistance to genotoxic stress, genome-wide localization and proper nonessential and essential gene expression. Interestingly, we show that the fusion of a transcriptional activating region to this ZA protein partially restores H2A.Z functions. Thereby, we show that the genome-wide location of H2A.Z at gene promoters and its global role in the regulation of gene expression are dependent on its C-terminal region. Here we provide evidence for a global role of the H2A.Z C-terminal region docking domain in regulation of gene transcription by coupling specific localization at gene promoters and the transcriptional outcome in yeast.

INTRODUCTION

The eukaryotic genome is organized as chromatin, of which the nucleosome is the basic unit. An individual nucleosome consists of an octameric histone core, formed by two H2A-H2B dimers and a H3-H4 tetramer, enveloped by 146 base pairs of DNA. This complex chromatin structure represents an obstacle to DNA-based processes, including gene transcription, DNA replication and DNA repair. Therefore, nucleosomes have to be remodeled in specific regions in order to make DNA accessible. Several fundamental mechanisms can alter chromatin structure including post-translational modifications of histones which may alter the histone properties or the interacting partners (Gelato and Fischle, 2008), ATP-dependent chromatin remodeling (Eberharter and Becker, 2004) and the replacement of canonical histones by histone variants that may change the histone composition of nucleosomes (Henikoff and Ahmad, 2005). The incorporation of histone variants creates specialized chromatin domains which can be permissive or not to transcription.

The histone H2A.Z, a variant of H2A, constitutes one of the histone variants which can be incorporated within chromatin in order to create specialized chromatin domains. H2A.Z is conserved in diverse eukaryotic organisms, from yeast to mammals, and replaces the canonical H2A histone in 5 to 10% of nucleosomes (Leach *et al.*, 2000). In *Saccharomyces cerevisiae*, H2A.Z is encoded by the *HTZ1* gene and is non-essential for viability, which greatly facilitates functional analyses of this histone variant (Carr *et al.*, 1994 and Jackson *et al.*, 1996). The histone variant H2A.Z plays roles in regulation of gene expression, DNA repair, maintenance of heterochromatic-euchromatic boundaries, chromosome segregation and resistance to genotoxic stress (Dhillon and Kamakaka,

2000; Santisteban *et al.*, 2000, Adam *et al.*, 2001; Meneghini *et al.*, 2003 and Zlatanova and Thakar, 2008).

In general, the three-dimensional structure of H2A.Z-containing nucleosomes is similar to that of H2A-containing nucleosomes. However, there are subtle differences in specific regions that differentiate structures of nucleosomes containing H2A or H2A.Z and that may explain their functional differences (Suto *et al.*, 2000). The main divergence between the structures of H2A and H2A.Z resides in the C-terminal docking domain of H2A.Z which presents less than 40% sequence identity with the corresponding region of H2A. In the nucleosome, the H2A.Z docking domain contacts the H3-H4 tetramer and forms an acidic residu extension which starts on the α C-helix of H2A.Z and continues onto histone H2B. This acidic surface of H2A.Z-containing nucleosomes is suggested to constitute a binding platform for interacting partners such as chromatin remodeling complexes or transcription coactivators (Suto *et al.*, 2000). The H2A.Z C-terminal docking domain contains the M6 region formed by 12 amino acids surrounding the α C helix. The swap of the H2A.Z M6 region for the corresponding region of H2A results in embryonic lethality in *D. melanogaster*, demonstrating that the M6 region is essential for H2A.Z function (Clarkson *et al.*, 1999). Furthermore, the last 20 amino acids in the C terminus of H2A.Z are critical for H2A.Z functions in resistance to genotoxic stress, maintenance of the heterochromatin-euchromatin boundaries and *GAL1* gene activation (Wang *et al.*, 2011).

SWR1-C is an ATP-dependent chromatin remodeling complex from the SWI/SNF family that catalyzes the exchange of a H2A-H2B dimer for a H2A.Z-H2B dimer in the nucleosome (Krogan *et al.*, 2003; Mizuguchi *et al.*, 2004 and Wu *et al.*, 2005). The histone chaperonnes Chz1 and Nap1 bind H2A.Z/H2B dimers and deliver them to the

SWR1-C for deposition into chromatin (Park *et al.*, 2005 and Luk *et al.*, 2007). The SWR1 complex is responsible for the incorporation of H2A.Z into the two nucleosomes (-1 and +1) flanking the nucleosome-free region (NFR) in promoter regions, because it is recruited to promoters by local histone acetylation and nucleosome-free stretches of DNA (Boudreault *et al.*, 2003; Ladurner *et al.*, 2003; Matangkasombut and Buratowski, 2003 and Durant and Pugh, 2007). It was initially suggested that the Swc2 subunit of SWR1-C was responsible for recognition and binding to the H2A.Z C-terminal docking domain of the H2A.Z/H2B dimer (Mizuguchi *et al.*, 2004 and Wu *et al.*, 2005). Although a loss of H2A.Z from chromatin can be observed when its C terminus is truncated, Wang *et al.* (2011) showed that the binding of H2A.Z to Swc2, as well as to histone H2B and the specific H2A.Z histone chaperone Chz1, is independent on its C-terminal docking domain.

A genomic localization study of H2A.Z by immunofluorescence in *D. melanogaster* revealed that H2A.Z is incorporated genome-wide but in a non-uniform and non-random manner (Leach *et al.*, 2000). Therefore, it has been suggested that H2A.Z is preferentially found in specific regions of the genome in alternance with regions comprising the canonical histone H2A. The deposition of H2A within chromatin is dependent on the S-phase DNA replication and H2A has a uniform genomic distribution. It has been demonstrated that H2A.Z occupies nucleosomes in most promoters in yeast (Guillemette *et al.*, 2005, Raisner *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005 and Millar *et al.*, 2006), and this genome-wide localization of H2A.Z at promoters is conserved in *Drosophila*, chicken, plants and mammals (Barski *et al.*, 2007; Mavrich *et al.*, 2008; Bruce *et al.*, 2005; Zilberman *et al.*, 2008; Gevry *et al.*, 2007 and Albert *et al.*, 2007). Indeed, Guillemette *et al.* (2005) estimate that about 63% of the yeast promoters contain the H2A.Z histone variant.

It was initially suggested that H2A.Z plays a positive role in the regulation of gene expression based on the observation that hv1, the H2A.Z version of *Tetrahymena thermophila*, was located in the transcriptionally active macronuclei (Allis *et al.*, 1980). Since then, several studies in *Saccharomyces cerevisiae* have shown that H2A.Z is involved in positive and negative regulation of gene transcription (Dhillon and Kamakaka, 2000; Santisteban *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 2001 and Meneghini *et al.*, 2003). The comparison of a wild-type and a *htz1Δ* mutant strain transcriptomes identified 214 and 109 genes whose expression is respectively activated or repressed by H2A.Z (Meneghini *et al.*, 2003). However, the authors suggest that the number of H2A.Z-activated genes could be higher since H2A.Z regulates the expression of several inducible genes under different specific conditions. Several studies have shown that the special function of H2A.Z in gene induction resides in its C-terminal region (Adam *et al.*, 2011; Larochelle and Gaudreau, 2003; Halley *et al.*, 2010 and Wang *et al.*, 2011). We showed that replacing the H2A.Z C-terminal docking domain by the corresponding region of H2A impairs the induction of *GAL* genes (Adam *et al.*, 2001 and Larochelle and Gaudreau, 2003). Interestingly, the addition of a transcriptional activating domain is sufficient to restore *GAL1* and *GAL7* activation (Larochelle and Gaudreau, 2003). In yeast, it is suggested that H2A.Z regulates transcription by positioning (Guillemette *et al.*, 2005), by destabilizing nucleosomes (Zhang *et al.*, 2005) and/or by contacting components of the transcription machinery (Adam *et al.*, 2001). In mammals, it has been demonstrated that H2A.Z is important for the local reorganization of chromatin and the regulation of transcription transactivation by transcription factors such as p53 (Gévry *et al.*, 2007) and nuclear receptors (Gévry *et al.*, 2009 and John *et al.*, 2008). H2A.Z is predominantly found in promoters of inactive or weakly transcribed genes and H2A.Z-containing nucleosomes are suggested to form a special chromatin structure that prepares the nucleosomes to be disassembled upon gene induction. Indeed, the association of H2A.Z with gene promoters and coding region is gradually lost following the induction of transcription in yeast and in mammals (Santisteban *et al.*, 2000, Adam *et al.*, 2001;

Guillemette *et al.*, 2005 and Hardy *et al.*, 2009). During transcription elongation, nucleosomes have to be remodeled to allow the passage of the RNA polymerase II leading to H2A.Z eviction by histone chaperones, such as FACT and Spt6, from gene promoters and gene bodies (Hardy *et al.*, 2009).

Although previous studies have shown that the C terminus of H2A.Z is required for H2A.Z function, the necessity of the H2A.Z C-terminal docking domain has not been studied extensively with regards to genome-wide location and transcriptional control. Here we provide evidence for a global role of the H2A.Z C-terminal region docking domain in regulation of gene transcription by coupling specific localization at gene promoters and the transcriptional outcome in yeast. Thus, in order to study the functional role of the H2A.Z C-terminal docking domain in its genomic localization and in the control of gene transcription, we used chimeric proteins derived from H2A.Z that bear modified C-terminal regions. We show that the genome-wide localization of H2A.Z at gene promoters is dependent on its C-terminal region. Furthermore, we show that the modification of the H2A.Z C-terminal docking domain leads to a loss of localization at promoters rather than a mislocalization of the protein. We also demonstrate that the special function of H2A.Z in regulation of gene transcription is dependent on its C-terminal region and that the modification of the C terminus affects the expression of genes involved in several biological processes.

MATERIAL AND METHODS

Yeast strains and plasmids

The wild type haploid strain W303a was used in this study. The *htz1Δ* and *swr1Δ* haploid strains were obtained by replacing the *HTZ1* or *SWR1* alleles with the gene. The HA-H2A.Z, HA-ZA and HA-ZA-rII' constructs used in this study are as described previously (Adam *et al.*, 2001 and Larochelle and Gaudreau, 2003). Briefly, all H2A.Z derivatives bear a HA tag inserted in the *BglIII* site of the *HTZ1* gene and were expressed from the *ACT1* promoter. The ZA fusion was made by fusing amino acids 91-132 of H2A to the C-terminal part of amino acids 1-97 of H2A.Z (Adam *et al.*, 2001). The ZA-rII' fusion was generated by adding amino acids 840-881 of Gal4 to the C-terminal end of ZA (Larochelle and Gaudreau, 2003). The plasmids were linearized and integrated at the endogenous *URA3* locus of *htz1Δ* or *swr1Δ* strains.

Phenotypic assays

The phenotypic assays were performed to determine the ability of H2A.Z derivatives to complement *htz1Δ*-mediated growth deficiency on different media supplemented with genotoxic stressors. Yeast cells were grown overnight to logarithmic phase in YPD (2% glucose) medium. Cells were washed and tenfold serial dilutions of strains were plated on YPD (2% glucose) medium supplemented or not with 100 mM HU, 3 mM caffeine or 0,02% MMS. Plates were incubated at 30°C for 3-5 days.

qRT-PCR

Cells were grown in YPD (2% glucose) medium to OD₆₀₀ of 0.6-0.8. For *GALI* transcription, cells were grown to an OD₆₀₀ of 0.5-0.6 in yeast extract medium containing 2% raffinose and galactose was then added to a final concentration of 2% for 60 min. Ten OD₆₀₀ units of cells were harvested for RNA extraction. RNA was digested with RNase-free DNase I (Invitrogen) and cDNA was synthesized using M-MuLV reverse transcriptase (Enzymatics) and oligo(dT). cDNA was analyzed using the appropriate oligonucleotides and Brilliant SYBR Green qPCR. mRNA levels were normalized to that of *ACT1* mRNA and normalized mRNA levels of *htz1Δ* and H2A.Z derivatives were then compared to mRNA levels of H2A.Z. Samples were analyzed in triplicate and qRT-PCR experiments were performed in duplicates.

Chromatin immunoprecipitations and ChIP-chip

ChIP experiments were performed in duplicates as previously described (Adam *et al.*, 2001; Guillemette *et al.*, 2005). Briefly, 50 mL of cells were grown in YPD (2% glucose) medium to an OD₆₀₀ of 0.6 and fixed with 1% formaldehyde for 10 min. 350 µl of whole-cell extract was incubated with either anti-HA (12CA5; Roche) or anti-H3 (ab1791; Abcam) antibody coupled to magnetic beads (Dynal) overnight at 4°C with agitation. Immunoprecipitated DNA was either used for genome-wide location analysis (see below) or qPCR analysis. For ChIP-qPCR analysis, immunoprecipitated DNA was mixed with the appropriate oligonucleotides and Brilliant SYBR Green qPCR mix in 20 µl final volume. The sequences of the oligonucleotides used for all of the qPCR experiments are available in Table S1. For genome-wide location analysis, H2A.Z, ZA and ZA-rII' ChIP DNA was hybridized in competition with H3 ChIP DNA or input DNA. The microarrays

used for location analysis were purchased from Agilent Technologies (Palo Alto, California, United States). The microarrays contain a total of 180,000 T_m -adjusted 60-mer probes covering the entire yeast genome with virtually no gaps between probes.

ChIP-chip data analysis

The ChIP-chip data were normalized using the Limma Loess method, and replicates were combined using a weighted average method as described previously (Ren *et al.*, 2000). The data were subjected to one round of smoothing using a Gaussian filter (SD = 100 bp). Aggregate profiles were generated using the Versatile Aggregate Profiler (VAP) (Coulombe *et al.*, 2014). In brief, genes were aligned on the TSS and the aligned data were averaged over 10 bp bins (200 bins upstream of the TSS and 200 bins downstream of the TSS).

RESULTS

The C-terminus of H2A.Z is required for H2A.Z function in gene induction and resistance to genotoxic stress

Previous reports have shown that the H2A.Z C-terminal docking domain is essential for H2A.Z unique function although the necessity of this region regarding its genome-wide location and gene induction has not been extensively studied. In order to study the functional role of the H2A.Z C-terminal docking domain, we used the ZA and ZA-rII' fusion proteins previously described (Adam *et al.*, 2001 and Larochelle and Gaudreau, 2003). Briefly, the ZA fusion protein was obtained by replacing the C-terminal docking domain of H2A.Z by the corresponding region of H2A (Figure 1A). Larochelle and Gaudreau (2003) hypothesized that the H2A.Z C-terminal region should harbour a function reminiscent of a transcriptional activating region and therefore created a chimeric protein by fusing the ZA protein to the Gal4 acidic transcriptional activating region (ZA-rII') (Figure 1A). We reasoned that a transcriptional activating domain could mimic the interactions with the H2A.Z C-terminal docking domain and therefore complement the phenotypes of *htz1Δ* cells. Western blotting experiments reveal that the ZA fusion protein and H2A are expressed at comparable levels, whereas H2A.Z and ZA-rII' are expressed at lower levels (Figure 1B). The deletion of *HTZ1* impairs the *GAL1* gene induction, as reported by several other studies (Figure 1C, lane 2) (Santisteban *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 2001 and Larochelle and Gaudreau, 2003). Previous reports have shown that the ZA fusion protein is able to assemble into nucleosome particles but could not restore the special H2A.Z function in gene induction. As shown previously by primer extension analysis (Adam *et al.*, 2001 and Larochelle and Gaudreau, 2003), we show by qRT-PCR that the expression of ZA downregulates *GAL1* gene transcription to a further extent than in *htz1Δ* cells (Figure 1C, lane 3). Interestingly, expression of ZA-rII' restores

full activation of the *GAL1* gene transcription by qRT-PCR (Figure 1C, lane 4), confirming that the addition of the transcriptional activating domain to the ZA fusion protein allows to rescue the transcription defects in *htz1Δ* cells as previously suggested (Larochelle and Gaudreau, 2003).

H2A.Z is involved in resistance to genotoxic stress and its function seems to be dependent on its C-terminal region since ZA expressing cells are sensitive to hydroxyurea (HU), a genotoxic stressor which arrests cells in S phase, similarly to *htz1Δ* sensitive cells (Larochelle and Gaudreau, 2003). Furthermore, the expression of ZA-rII' rescues the *htz1Δ*-mediated HU growth deficiency supporting the hypothesis that the H2A.Z C-terminal docking domain harbours a function that resembles that of a transcriptional activating region. Cells containing H2A.Z truncated versions of the C-terminal region are sensitive to genotoxic stressors, such as formamide, caffeine and HU (Wang *et al.*, 2011), we therefore tested the ability of the H2A.Z derivatives to confer resistance to genotoxic stress induced by HU and caffeine, as well as methyl methanesulfonate (MMS). Cells containing the H2A.Z copy had normal growth in comparison to wild-type cells (Figure 1D). Cells containing the ZA fusion protein exhibited retarded growth on all drugs, similarly or to a greater extent than *htz1Δ* mutant cells (Figure 1D). Interestingly, the expression of the ZA-rII' fusion protein can reverse the growth deficiency of *htz1Δ* mutant cells on HU and caffeine, but not on MMS-containing media (Figure 1D). MMS is an alkylating agent which modifies both guanine and adenine to cause base mispairing and replication blocks, respectively, and are repaired by the base excision repair (BER) and DNA alkyltransferases (Beranek, 1990 and Lindahl and Wood, 1999).

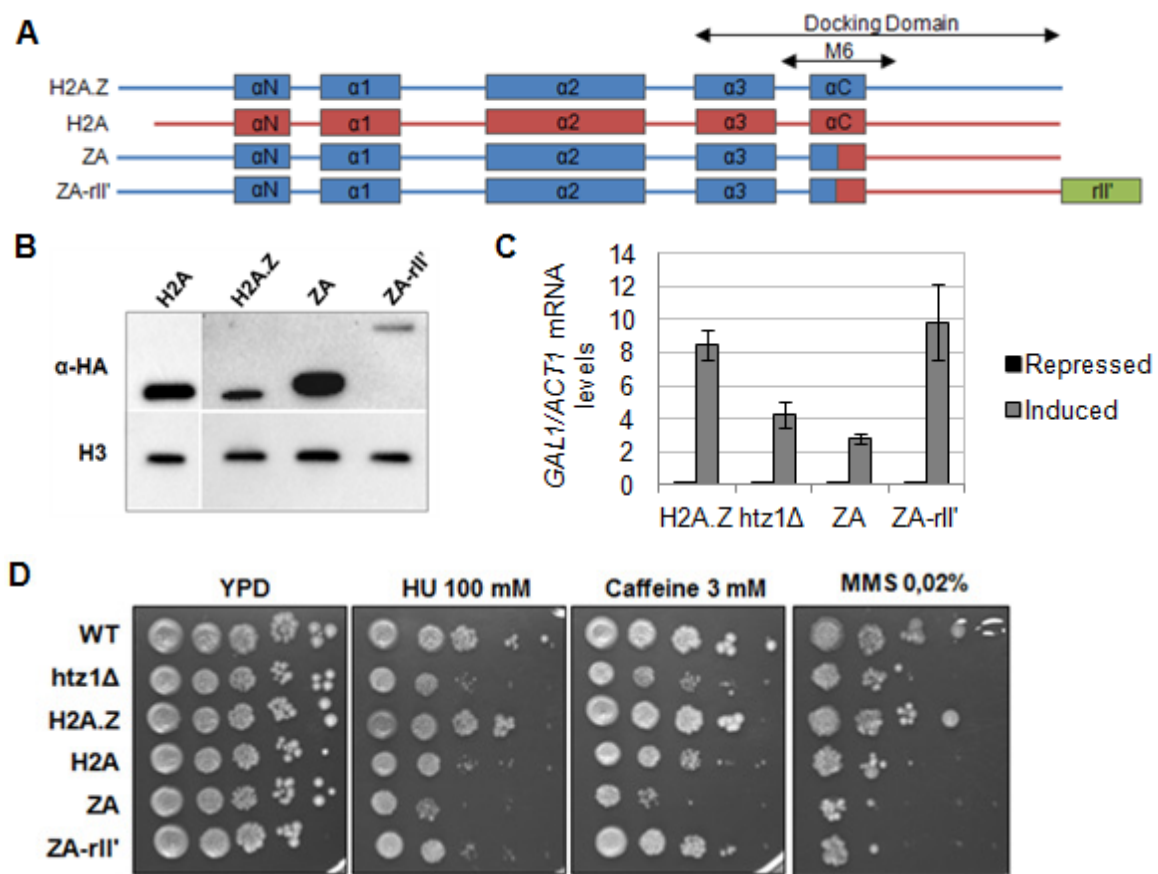


Figure 1. The C terminus of H2A.Z is required for H2A.Z special function

(A) Schematic representation of the H2A.Z derivatives used in this study. The fusions bear a HA tag in their N-terminus. The positions of the alpha helices, the M6 region and the docking domain are indicated. (B) Immunoblot analysis of H2A and H2A.Z chimeras. The histone protein levels were determined by immunoblotting with an anti-HA antibody. (C) Ability of H2A.Z derivatives to induce *GAL1* expression in *htz1 Δ* cells. Cells were grown in culture media containing 2% raffinose and *GAL1* expression was induced by adding 2% galactose. *GAL1* expression was quantified by qRT-PCR and quantitative PCR signals were normalized to the expression level of ACT1. (D) Ability of H2A.Z derivatives to complement *htz1 Δ* -mediated growth deficiency on rich media (YPD) supplemented with hydroxyurea (HU) 100 mM, caffeine 3 mM or methyl methanesulfonate (MMS) 0.02%. Tenfold serial dilutions of yeast cell suspensions were dropped on media and plates were incubated at 30°C for 2-5 days.

Genome-wide location analysis of H2A.Z, ZA and ZA-rII'

Although the necessity of the H2A.Z C terminus has been studied with regards to local H2A.Z incorporation within chromatin and H2A.Z binding to SWR1-C (Adam *et al.*, 2001, Larochelle and Gaudreau, 2003 and Wu *et al.*, 2005 and Wang *et al.*, 2011), the involvement of the H2A.Z C-terminal docking domain in its genome-wide location has not been investigated yet. Therefore, we set out a genome-wide location assay (ChIP-chip) to map H2A.Z and the H2A.Z derivatives across the yeast genome and gain insights on the role of the H2A.Z C terminus in its genomic localization.

ChIP assays to immunoprecipitate (IP) our target DNA molecules of interest were performed using yeast strains bearing HA epitopes on H2A.Z, ZA and ZA-rII'. In every case, a ChIP for histone H3 (using an anti-H3 antibody) was hybridized together with the H2A.Z, ZA or ZA-rII' ChIPs to control for nucleosomal density. Samples were co-hybridized to an array containing a total of 180,000 60-mer probes (including controls) covering the entire yeast genome with virtually no gaps between the probes. In addition, other control experiments where H2A.Z, ZA and ZA-rII' ChIPs are hybridized against input DNA were performed. All experiments were performed in duplicate and combined using a weighted average method (Ren *et al.*, 2000). A Gaussian filter was applied to the datasets in order to create a smooth interpolation occupancy curve.

Genomic data visualization using UCSC Genome Browser allowed to determine that the Z, ZA and ZA-rII' loci are widely distributed across the yeast genome and in a non-random manner for all 16 chromosomes (see Figure 2A for a map of Chromosome III and Table X to see the whole genome). The H2A.Z genome-wide location data obtained here

is in agreement with localization results previously obtained in yeast (Meneghini *et al.*, 2003; Guillemette *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Raisner *et al.*, 2005 et Zhang *et al.*, 2005).

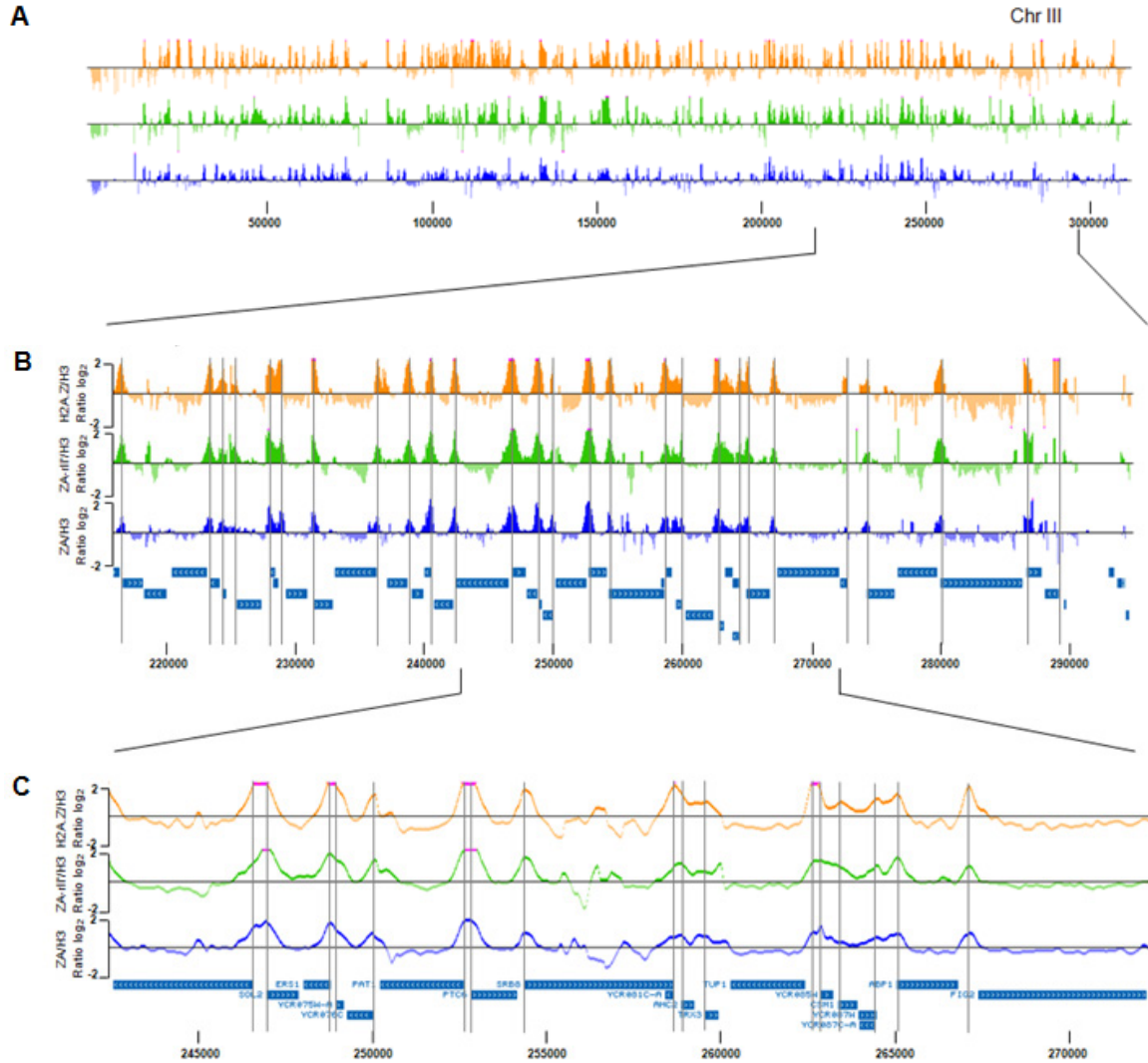


Figure 2. Genome-wide location analysis of H2A.Z, ZA and ZA-rII'; a zoom on chromosome III

(A) The locations of H2A.Z (orange bars), ZA-rII' (green bars) and ZA (blue bars) are shown in raw log₂ ratios along chromosome III. (B) A zoom of a 80 KB region between positions 220000-290000 shows the log₂ ratios of H2A.Z/H3 (orange bars), ZA-rII'/H3 (green bars) and ZA/H3 (blue bars) of the raw data for each probe in that region. The genes in that region are depicted in gray. (C) A zoom of a 35 KB region between positions 240000-270000 shows the log₂ ratios of H2A.Z/H3 (orange line), ZA-rII'/H3 (green line) and ZA/H3 (blue line) of the smoothed data obtained by applying a Gaussian filter to the raw data for each probe in this region.

In general, H2A.Z enrichment peaks overlap ZA and ZA-rII' peaks suggesting that all three proteins follow the same non-random genomic distribution. Comparison of the localization signals reveals that the localization signal and enrichment peaks are globally diminished for the ZA fusion protein than for H2A.Z and ZA-rII' (Figures 2B and 2C), suggesting at first sight that the modification of the H2A.Z C-terminal docking domain does not affect the localization of the enrichment peaks of the histone variant in the yeast genome, but rather the level of incorporation of the protein within chromatin. Manual inspection of the data suggests that Z, ZA and ZA-rII' loci are predominantly located within promoter regions compared with gene bodies (Figures 2B and 2C). H2A.Z is involved in several cellular processes and multiple groups have reported an association of H2A.Z to particular chromosome elements and other transcribed elements (Meneghini *et al.*, 2003; Krogan *et al.*, 2004; Guillemette *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011). Given that the various functions of H2A.Z seem to be associated with its genome-wide localization, we verified if the localization of H2A.Z at centromeres, replication origins, HZAD (*Htz1*-activated domain) genes, tRNA genes and small nuclear RNA (snoRNA) genes is dependent on its C-terminal region (Figure 3). We found that H2A.Z is enriched around centromeres and replication origins as expected, but the H2A.Z distribution pattern changes when the C-terminal docking domain is modified (Figures 3A and 3B), which may affect its role in chromosome segregation and DNA replication. H2A.Z is enriched around the TSS of HZAD genes, tRNA genes and snoRNA genes (Figures 3C-3E), suggesting that the role of H2A.Z in transcription is not limited to pol II-transcribed genes but also to pol III-transcribed genes. Furthermore, the replacement of the H2A.Z C-terminal region by the corresponding region of H2A causes a loss of the H2A.Z derivative over those genes (Figures 3C-3E). Interestingly, the addition of the transcriptional activating domain partially restores the localization over the HZAD genes and tRNA genes (Figures 3C and 3D), but not over the snoRNA genes (Figure 3E). In all cases, these results suggest that the H2A.Z C-terminal docking domain has a role in the transcription of the protein-coding genes, but also in the transcription of other transcribed elements.

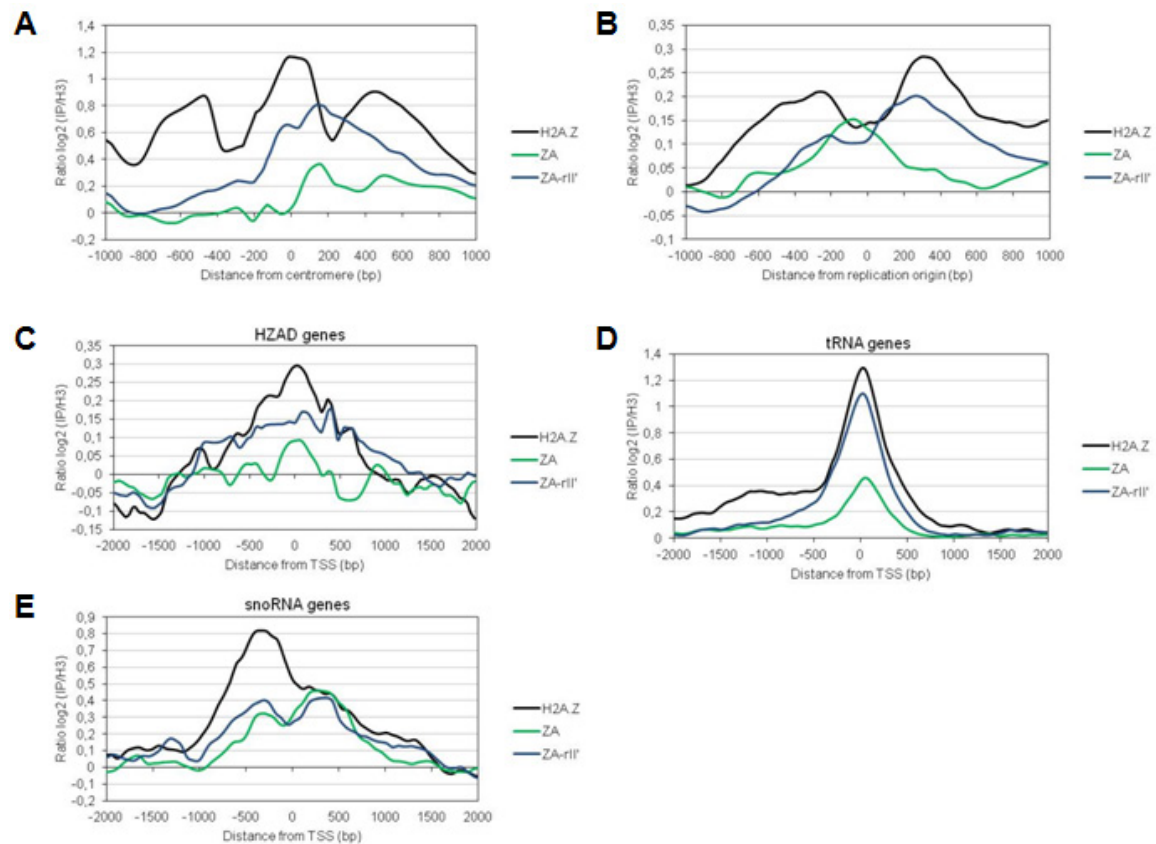


Figure 3. H2A.Z, ZA and ZA-rII' occupancies at particular chromosome elements and other transcribed elements

Alignment of genomic data (smoothed log₂ ratios) with respect to a reference point or to coordinates, over particular chromosome elements and other transcribed elements using the Versatile Aggregate Profiler (VAP) tool. Representation of the average occupancy of H2A.Z duplicates (black line), ZA-rII' duplicates (blue line) and ZA duplicates (green line) over centered centromeres (A), centered replication origins (B), the TSS of HZAD genes (C), the TSS of tRNA genes (D), and the TSS of snoRNA genes (E) are shown.

The genome-wide location of H2A.Z at gene promoters is dependent on its C-terminal region

Several genome-wide studies showed that H2A.Z is preferentially localized at promoter and regulatory regions and that this localization is conserved from yeast to mammals

(Guillemette *et al.*, 2005, Raisner *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Millar *et al.*, 2006; Barski *et al.*, 2007; Mavrich *et al.*, 2008; Bruce *et al.*, 2005; Zilberman *et al.*, 2008; Gevry *et al.*, 2007 and Albert *et al.*, 2007). Larochelle and Gaudreau (2003) showed that the distribution of ZA over the *PHO5* and *PUR5* locus is similar to that of H2A rather than to H2A.Z, suggesting that the localization of H2A.Z at gene promoters is dependent on its C-terminal region. A first manual inspection of our genomic data suggests that H2A.Z is predominantly located within promoter regions as expected and that the distributions of ZA and ZA-rII' are similar to that of H2A.Z (Figures 2B and 2C). This feature is illustrated in Figure 2C, which shows a zoom on the H2A.Z, ZA and ZA-rII' occupancies in a 30 KB region between position 240,000 - 270,000 on Chromosome III. An enrichment of H2A.Z, ZA and/or ZA-rII' is observed upstream of every ORF shown in Figure 2C, and very few genes show an enrichment of H2A.Z, ZA and/or ZA-rII' in the coding region. The intergenic region where two genes converge, for example *SOL2* and *ERS1*, do not show an enrichment of H2A.Z, ZA or ZA-rII'. The intergenic region between two divergent genes, for example *YCR087C-A* and *ABP1*, contains two separate enrichment peaks of H2A.Z, ZA and ZA-rII', supporting the idea that almost each promoter is enriched in H2A.Z.

In order to determine the involvement of the H2A.Z C-terminal docking domain in its genomic localization at promoters, we profiled H2A.Z, ZA and ZA-rII' localizations over yeast promoters using the Versatile Aggregate Profiler (VAP) tool (Coulombe *et al.*, 2014). The enrichment data was aligned for all genes with respect to a reference point, the transcription start site (TSS), and shows that H2A.Z is enriched in the promoter regions compared to coding regions, as expected (Figure 4A). The distribution of ZA-rII' is similar to that of H2A.Z over yeast promoters showing that the addition of the transcriptional activating region to the ZA fusion protein partially restores the localization at gene promoters genome-wide (Figure 4A). When the H2A.Z C-terminal region is replaced by the corresponding region of H2A, a decreased signal is observed over yeast

promoters (Figure 4A), indicating that the specific genome-wide localization of H2A.Z at promoters is dependent on its C-terminal region. Moreover, we performed ChIP-chip using an alternative normalization method, on the ChIP input DNA, in order to verify if the observed enrichment peaks over the TSS of yeast genes aren't due to the nucleosome-free region in the promoter regions. As for the normalization on nucleosomal density, we observed a H2A.Z enrichment over yeast promoters and a ZA-rII' enrichment but at a lower level (Figure 4B). We observe a small ZA peak over the TSS, but the ZA signal at the TSS is lower than in the coding region, confirming that the H2A.Z genome-wide location of H2A.Z over gene promoters is dependent on its C-terminal region. Interestingly, we compared the H2A.Z, ZA and ZA-rII' occupancies over yeast promoters to that of the total nucleosomes (Figure 4B). Importantly, the H2A.Z enrichment peak overlap with the +1 nucleosome over yeast promoters as expected, but we observe a shifting of the ZA-rII' and ZA peaks toward the +2 nucleosome in a genome-wide manner. In order to confirm these data, we performed ChIP-qPCR experiments to measure and compare the H2A.Z, ZA and ZA-rII' occupancies over the *DAL5* locus. A zoom in a 7 Kb region on ChrX shows the ChIP-chip data for H2A.Z, ZA and ZA-rII' occupancies over the *DAL5* locus (Figure 4C). Reminiscent of the genomic data, we observe an enrichment of all three proteins of interest in the intergenic region between the *DAN4* and *DAL5* genes (Figure 4D).

The H2A.Z, ZA and ZA-rII' distribution profiling over yeast promoters using VAP allowed to determine the number of genes with at least a 2-fold enrichment (\log_2 value ≥ 1) of H2A.Z, ZA or ZA-rII' at the TSS. We identified 2240 genes which showed at least a 2-fold enrichment of H2A.Z at the TSS, and called them " H2A.Z-associated genes ". These genes represent 44% of the yeast verified ORFs and are potentially transcriptionally H2A.Z-regulated genes. We also identified 1128 ZA-rII'-associated

genes (22% of verified ORFs) and 370 ZA-associated genes (7%).

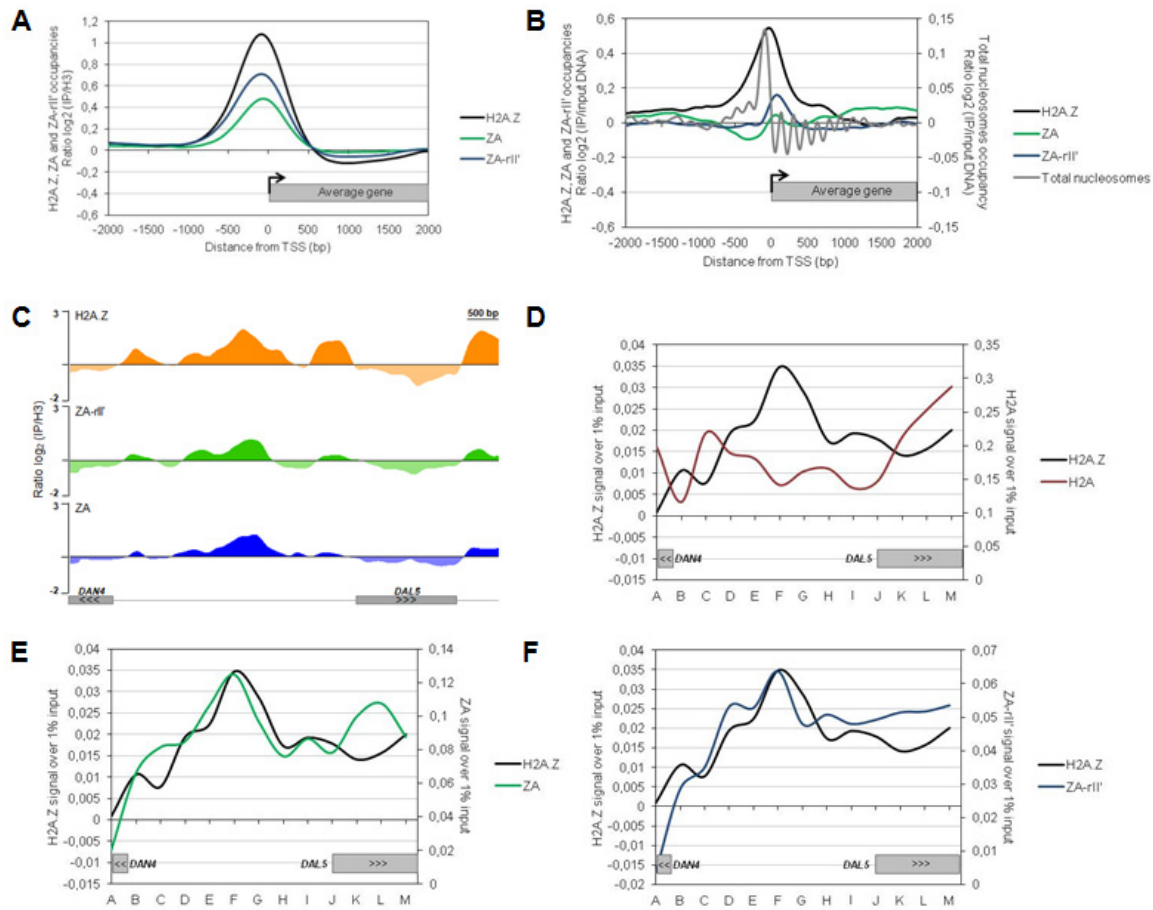


Figure 4. H2A.Z and ZA-rII' are enriched in promoter regions compared with coding regions

(A) Alignment of genomic data (smoothed log₂ ratios) with respect to a reference point, the transcription start site. Representation of the average occupancy normalized on nucleosomal density of H2A.Z duplicates (black line), ZA-rII' duplicates (blue line) and ZA duplicates (green line) over the promoters of the 5060 verified open reading frames in yeast. (B) Alignment of the smoothed data (log₂ ratios) of H2A.Z, ZA and ZA-rII' IPs normalized on input DNA and the total nucleosomes (gray line) over the yeast promoters. (C) A zoom of a 7 KB region between positions 715000-722000 on chromosome X shows the log₂ ratios of H2A.Z/H3 (orange line), ZA-rII'/H3 (green line) and ZA/H3 (blue line) of the smoothed data over the *DAL5* locus for each probe in this region. (D), (E) and (F) *htz1Δ* strains complemented by one copy of H2A.Z, H2A, ZA or ZA-rII' bearing a HA tag for co-immunoprecipitation were used to carry out ChIP-qPCR experiments in order to determine their distributions over the *DAL5* locus under non-induced transcriptional conditions. Histones occupancies over the *DAL5* locus were assessed by quantitative PCR and the IPs signals were normalized to input DNA.

The Comparison of the H2A.Z-, ZA-, and ZA-rII'-associated genes sets allowed to identify unique and shared associated genes among the three proteins of interest. Of the 2240 H2A.Z-associated genes, 1188 genes (53%) are only associated with H2A.Z, which means the association of H2A.Z to those genes is lost when its C-terminal region is modified (Figure 5A). The replacement of the H2A.Z C-terminal region by the corresponding region of H2A causes a loss of occupancy at 1884 gene promoters compared to H2A.Z, but the localization is conserved at 356 gene promoters since 356 of the 370 ZA-associated genes, overlap with the H2A.Z-associated genes set (Figure 5A). Interestingly, the addition of the acidic transcriptional activating domain to the ZA fusion protein restores the localization at 696 genes compared to the ZA protein alone, but still causes the loss of incorporation of the H2A.Z derivative at 1225 gene promoters (Figure 5A), supporting the idea that the modification of the H2A.Z C-terminal region causes a loss of occupancy at promoters rather than a mislocalization of the protein. We set out to determine if the loss of H2A.Z derivatives from chromatin at gene promoters is due to a loss of binding to SWR1-C, the ATP-dependent remodeler responsible for exchanging H2A/H2B for H2A.Z/H2B dimers in the nucleosome (Krogan *et al.*, 2003; Mizuguchi *et al.*, 2004 and Wu *et al.*, 2005). We performed ChIP-qPCR experiments to measure and compare the H2A.Z, ZA and ZA-rII' occupancies over the *DAL5* locus in a wild-type (WT) and a *swr1Δ* mutant strains. A zoom in a 7 Kb region on ChrX shows the ChIP-chip data for H2A.Z, ZA and ZA-rII' occupancies over the *DAL5* locus (Figure 4B). Reminiscent of the genomic data, we observe an enrichment of all three proteins of interest in the intergenic region between the *DAN4* and *DAL5* genes in the WT strains (Figure 5C). However, we observe a change of the H2A.Z, ZA and ZA-rII' distribution patterns in the *swr1Δ* mutant strains namely we observe a loss of the enrichment peaks and a more uniform distribution over promoter and coding regions (Figure 5C). These results suggest that the SWR1 complex incorporates H2A.Z as well as ZA and ZA-rII'

within chromatin at gene promoters and that the loss of H2A.Z derivatives from gene promoters is not due to an inability of the H2A.Z derivatives to bind to SWR1-C.

H2A.Z and ZA-rII' occupy TFIID-enriched promoters of inactive or weakly transcribed genes

H2A.Z is involved in the regulation of transcription and gene expression (Dhillon and Kamakaka, 2000; Santisteban *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 2001 and Meneghini *et al.*, 2003), and the C terminus of H2A.Z is required for proper *GALI* expression (Adam *et al.*, 2001; Larochelle and Gaudreau, 2003 and Wang *et al.*, 2011). Gene promoters are divided as either TATA-containing or TATA-less and transcription from these promoters is mainly mediated by SAGA and TFIID, respectively (Basehoar *et al.*, 2004 and Huisinga and Pugh, 2004). A clear negative correlation between H2A.Z occupancy and the presence of a TATA box in the promoter has been reported, and therefore, it has been suggested H2A.Z preferentially occupies TATA-less promoters (Zhang *et al.*, 2005). We observe that the vast majority of H2A.Z-associated genes occupy TATA-less (74%) and TFIID-enriched (70%) promoters (Figure 6A), confirming the previous study. Moreover, ZA-rII'-associated genes preferentially occupy TATA-less (77%) and TFIID-enriched (73%) promoters as well (Figure 6B). These results suggest that the H2A.Z C-terminal region mediates interactions with similar downstream effectors than the Gal4 yeast activator leading to transcriptional control.

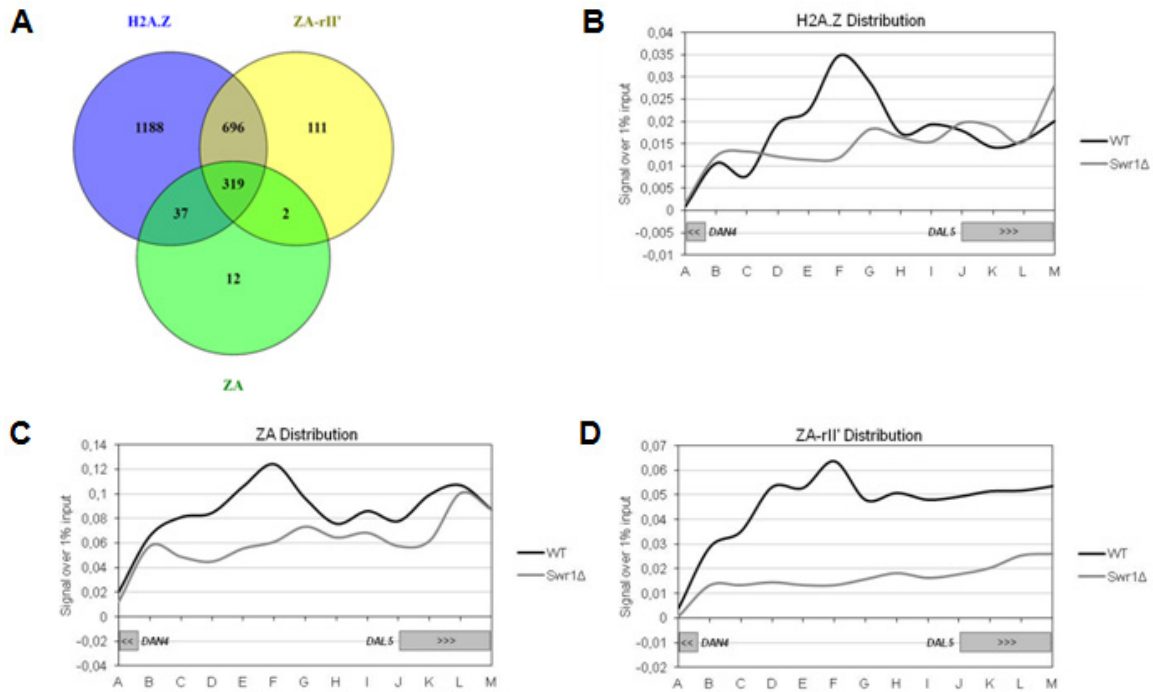


Figure 5. The modification of the C-terminal region of H2A.Z causes a SWR1-C independent loss of localization at promoters

(A) Venn diagram depicting the overlapping and unique H2A.Z, ZA and ZA-rII'-associated genes. 1188 genes are uniquely associated with H2A.Z showing that the localization at about half of the potential H2A.Z-regulated genes is lost when the H2A.Z C terminus is modified. The expression of ZA-rII' partially restored the localization at 696 genes when compared to ZA. The majority of ZA-associated genes overlap with H2A.Z-associated genes. (B), (C) and (D) *htz1Δ swr1Δ* strains complemented by one copy of H2A.Z (B), ZA (C) or ZA-rII' (D) bearing a HA tag for co-immunoprecipitation were used to carry out ChIP-qPCR experiments in order to determine their distributions over the *DAL5* locus under non-induced transcriptional conditions. Histone occupancies over the *DAL5* locus were assessed by quantitative PCR and the IPs signals were normalized to input DNA.

In yeast, H2A.Z marks promoters of inactive or weakly transcribed genes and prepares nucleosomes for disassembly upon gene induction (Santisteban *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 2001; Guillemette *et al.*, 2005 et Hardy *et al.*, 2009). A negative correlation between H2A.Z occupancy at promoters and transcription rate has been reported and implicated in regulating gene expression (Santisteban *et al.*, 2000; Guillemette *et al.*, 2005 and Zhang *et al.*, 2005). We observe that the H2A.Z and ZA-rII' occupancies at gene promoters are

inversely correlated to the RNA pol II occupancy, the expression level and transcription rates of all verified genes (Figures 6C and 6D). These results suggest that the H2A.Z C-terminal region is not only important for proper localization at promoters, but that the C-terminal region links H2A.Z dynamics at gene promoters and the transcriptional outcome.

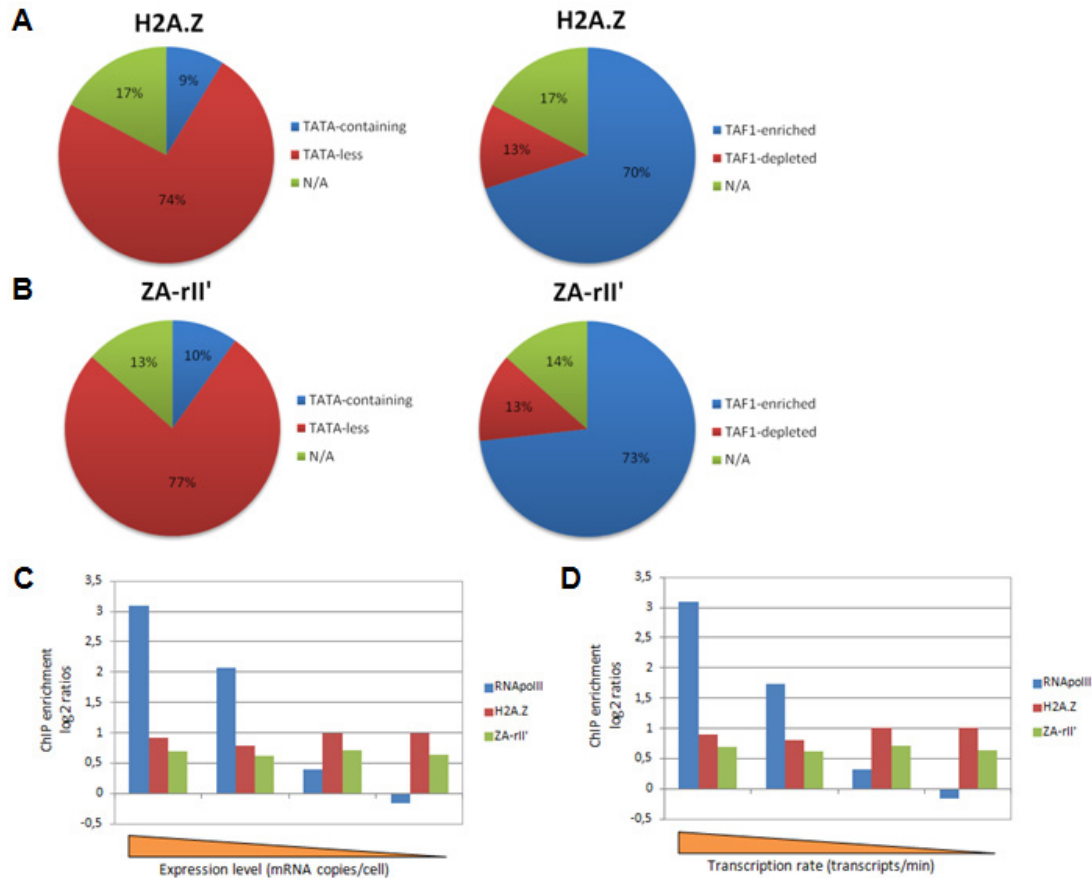


Figure 6. H2A.Z and ZA-rII' occupy TFIIID-enriched promoters of inactive or weakly transcribed genes

(A) The percentage of TATA-less or TATA-containing and TAF1-enriched or TAF1-depleted promoters among the 2240 H2A.Z-associated are shown. (B) Same as in (A) but for the 1128 ZA-rII'-associated genes. (C) H2A.Z and ZA-rII' occupancies are inversely correlated with RNA polymerase II occupancy and the expression level (mRNA copies/cell). Genes were sorted by expression level and separated into 4 groups of decreasing expression level (x axis), and compared to H2A.Z, ZA-rII' and RNA polymerase II occupancies of ChIP enrichment (log2 ratio, y axis). (D) Same as in (C) but genes were sorted by transcription rate (transcripts/min), and compared to H2A.Z, ZA-rII' and RNA polymerase II occupancies.

A global role for the H2A.Z C-terminal docking domain in gene transcription regulation in several biological processes

Given that the expression of a great proportion of genes is potentially regulated by H2A.Z (44% of verified ORFs), we propose that the H2A.Z C-terminal docking domain plays an essential role in the regulation of several biological processes. We used the AmiGO tool (Princeton University) in order to identify significant unique and shared Gene Ontology terms among H2A.Z, ZA and ZA-rII'-associated genes and to determine in which biological processes they are classified (Tables 1, 2 and 3). We identified a few biological processes for which a role of H2A.Z was previously reported (Zlatanova et Thakar, 2008), and that were significantly enriched among our H2A.Z-associated genes (Table 1), for example transcription from RNA polymerase II promoter ($-\text{Log}(\text{p-value}) = 18,0306$), DNA repair ($-\text{Log}(\text{p-value}) = 12,3215$), chromosome segregation ($-\text{Log}(\text{p-value}) = 8,9031$), chromatin silencing ($-\text{Log}(\text{p-value}) = 5,7520$), and RNA splicing ($-\text{Log}(\text{p-value}) = 5,2733$). Interestingly, most of these biological processes were not or less enriched among ZA and ZA-rII'-associated genes (Tables 2-4). Moreover, the enrichment of some of the biological processes is conserved between H2A.Z and ZA-rII'-associated genes (Table 4), for example transcription from RNA polymerase II promoter ($-\text{Log}(\text{p-value}) = 18,0306$ and $18,1001$, respectively), chromatin organization ($-\text{Log}(\text{p-value}) = 15,0039$ and $15,6253$, respectively), and protein complex biogenesis ($-\text{Log}(\text{p-value}) = 6,9469$ and $5,3958$, respectively). Surprisingly, only one biological process, DNA-templated transcription, initiation, is significantly enriched among H2A.Z, ZA and ZA-rII'-associated genes. Our Gene Ontology term enrichment analysis of H2A.Z, ZA and ZA-rII'-associated genes indicate that the H2A.Z C-terminal region could be important for regulation of genes involved in several biological processes.

Table 1. Gene Ontology term enrichment for H2A.Z-associated genes

GO Term	GO ID	GO Term Usage in Gene List	Genome Frequency of Use	-Log(p-value)
cytoskeleton organization	GO:0007010	158 of 2240 genes, 7,05%	254 of 6448 genes, 3,94%	20,853872
transcription from RNA polymerase II promoter	GO:0006366	267 of 2240 genes, 11,92%	526 of 6448 genes, 8,16%	18,0305841
mitotic cell cycle	GO:0000278	204 of 2240 genes, 9,11%	372 of 6448 genes, 5,77%	18
chromatin organization	GO:0006325	186 of 2240 genes, 8,30%	345 of 6448 genes, 5,35%	15,0039263
cellular response to DNA damage stimulus	GO:0006974	183 of 2240 genes, 8,17%	342 of 6448 genes, 5,30%	14,2448877
DNA repair	GO:0006281	159 of 2240 genes, 7,10%	295 of 6448 genes, 4,58%	12,3214816
regulation of organelle organization	GO:0033043	166 of 2240 genes, 7,41%	315 of 6448 genes, 4,89%	11,7825161
organelle fission	GO:0048285	157 of 2240 genes, 7,01%	298 of 6448 genes, 4,62%	10,954677
mRNA processing	GO:0006397	123 of 2240 genes, 5,49%	219 of 6448 genes, 3,40%	10,5751184
regulation of cell cycle	GO:0051726	144 of 2240 genes, 6,43%	269 of 6448 genes, 4,17%	10,530178
Golgi vesicle transport	GO:0048193	115 of 2240 genes, 5,13%	202 of 6448 genes, 3,13%	10,2533658
chromosome segregation	GO:0007059	121 of 2240 genes, 5,40%	223 of 6448 genes, 3,46%	8,90308999
RNA catabolic process	GO:0006401	88 of 2240 genes, 3,93%	153 of 6448 genes, 2,37%	7,4828041
protein targeting	GO:0006605	107 of 2240 genes, 4,78%	198 of 6448 genes, 3,07%	7,37986395
protein complex biogenesis	GO:0070271	159 of 2240 genes, 7,10%	330 of 6448 genes, 5,12%	6,94692156
tRNA processing	GO:0008033	76 of 2240 genes, 3,39%	130 of 6448 genes, 2,02%	6,53313238
nucleus organization	GO:0006997	50 of 2240 genes, 2,23%	75 of 6448 genes, 1,16%	6,10846254
DNA-templated transcription, initiation	GO:0006352	55 of 2240 genes, 2,46%	86 of 6448 genes, 1,33%	5,9625735
chromatin silencing	GO:0006342	86 of 2240 genes, 3,8%	157 of 7166 genes, 2,2%	5,75202673
peptidyl-amino acid modification	GO:0018193	114 of 2240 genes, 5,09%	226 of 6448 genes, 3,50%	5,59516628
signaling	GO:0023052	171 of 2240 genes, 7,63%	373 of 6448 genes, 5,78%	5,537602
nucleobase-containing compound transport	GO:0015931	108 of 2240 genes, 4,82%	213 of 6448 genes, 3,30%	5,30980392
nuclear transport	GO:0051169	97 of 2240 genes, 4,33%	186 of 6448 genes, 2,88%	5,30103
RNA splicing	GO:0008380	87 of 2240 genes, 3,88%	162 of 6448 genes, 2,51%	5,27327279
organelle assembly	GO:0070925	90 of 2240 genes, 4,02%	172 of 6448 genes, 2,67%	4,80410035
DNA-templated transcription, elongation	GO:0006354	59 of 2240 genes, 2,63%	100 of 6448 genes, 1,55%	4,63638802
DNA replication	GO:0006260	83 of 2240 genes, 3,71%	158 of 6448 genes, 2,45%	4,30715308
regulation of translation	GO:0006417	80 of 2240 genes, 3,57%	155 of 6448 genes, 2,40%	3,61978876
response to chemical	GO:0042221	225 of 2240 genes, 10,04%	541 of 6448 genes, 8,39%	3,58502665
histone modification	GO:0016570	72 of 2240 genes, 3,21%	136 of 6448 genes, 2,11%	3,537602
organelle fusion	GO:0048284	60 of 2240 genes, 2,68%	109 of 6448 genes, 1,69%	3,24412514

mitochondrion organization	GO:0007005	123 of 2240 genes, 5,49%	269 of 6448 genes, 4,17%	3,06550155
transmembrane transport	GO:0055085	155 of 2240 genes, 6,92%	472 of 6448 genes, 7,32%	2,9788107
DNA recombination	GO:0006310	88 of 2240 genes, 3,93%	242 of 6448 genes, 3,75%	2,80410035
mitochondrial translation	GO:0032543	84 of 2240 genes, 3,75%	171 of 6448 genes, 2,65%	2,7235382
regulation of DNA metabolic process	GO:0051052	59 of 2240 genes, 2,63%	110 of 6448 genes, 1,71%	2,627088
protein phosphorylation	GO:0006468	108 of 2240 genes, 4,82%	234 of 6448 genes, 3,63%	2,57675413
transcription from RNA polymerase III promoter	GO:0006383	28 of 2240 genes, 1,25%	41 of 6448 genes, 0,64%	2,46344156
rRNA processing	GO:0006364	134 of 2240 genes, 5,98%	351 of 6448 genes, 5,44%	2,31785492
endosomal transport	GO:0016197	59 of 2240 genes, 2,63%	112 of 6448 genes, 1,74%	2,28399666
ribosome biogenesis	GO:0042254	195 of 2240 genes, 8,7%	475 of 7166 genes, 6,6%	2,22841252
proteolysis involved in cellular protein catabolic process	GO:0051603	114 of 2240 genes, 5,09%	255 of 6448 genes, 3,95%	2,03105032

Table 2. Gene Ontology term enrichment for ZA-rII'-associated genes

GO Term	GO ID	GO Term Usage in Gene List	Genome Frequency of Use	-Log(p-value)
transcription from RNA polymerase II promoter	GO:0006366	168 of 1128 genes, 14,89%	526 of 6448 genes, 8,16%	18,1007268
chromatin organization	GO:0006325	121 of 1128 genes, 10,73%	345 of 6448 genes, 5,35%	15,6252517
mitotic cell cycle	GO:0000278	107 of 1128 genes, 9,49%	372 of 6448 genes, 5,77%	6,97469413
peptidyl-amino acid modification	GO:0018193	74 of 1128 genes, 6,56%	226 of 6448 genes, 3,50%	6,68824614
DNA-templated transcription, initiation	GO:0006352	38 of 1128 genes, 3,37%	86 of 6448 genes, 1,33%	6,16749109
histone modification	GO:0016570	51 of 1128 genes, 4,52%	136 of 6448 genes, 2,11%	6,02965312
cytoskeleton organization	GO:0007010	78 of 1128 genes, 6,91%	254 of 6448 genes, 3,94%	5,70114692
regulation of organelle organization	GO:0033043	91 of 1128 genes, 8,07%	315 of 6448 genes, 4,89%	5,58502665
protein complex biogenesis	GO:0070271	85 of 1128 genes, 7,54%	330 of 6448 genes, 5,12%	5,39577395
cellular response to DNA damage stimulus	GO:0006974	96 of 1128 genes, 8,51%	342 of 6448 genes, 5,30%	5,32239305
nuclear transport	GO:0051169	60 of 1128 genes, 5,32%	186 of 6448 genes, 2,88%	4,60730305
nucleus organization	GO:0006997	32 of 1128 genes, 2,84%	75 of 6448 genes, 1,16%	4,3053948
DNA repair	GO:0006281	83 of 1128 genes, 7,36%	295 of 6448 genes, 4,58%	4,2541448
nucleobase-containing compound transport	GO:0015931	64 of 1128 genes, 5,67%	213 of 6448 genes, 3,30%	3,76955108
RNA catabolic process	GO:0006401	50 of 1128 genes, 4,43%	153 of 6448 genes, 2,37%	3,58502665
regulation of cell cycle	GO:0051726	75 of 1128 genes, 6,65%	269 of 6448 genes, 4,17%	3,39794001
chromosome segregation	GO:0007059	65 of 1128 genes, 5,76%	223 of 6448 genes, 3,46%	3,32790214
protein acylation	GO:0043543	31 of 1128 genes, 2,75%	78 of 6448 genes, 1,21%	3,23657201

transmembrane transport	GO:0055085	80 of 1128 genes, 7,09%	472 of 6448 genes, 7,32%	3,18708664
chromatin silencing	GO:0006342	50 of 1128 genes, 4,4%	157 of 7166 genes, 2,2%	3,18045606
DNA-templated transcription, elongation	GO:0006354	36 of 1128 genes, 3,19%	100 of 6448 genes, 1,55%	2,93181414
mRNA processing	GO:0006397	63 of 1128 genes, 5,59%	219 of 6448 genes, 3,40%	2,91364017
mitochondrion organization	GO:0007005	73 of 1128 genes, 6,47%	269 of 6448 genes, 4,17%	2,72815839
ribosome biogenesis	GO:0042254	37 of 1128 genes, 3,28%	120 of 6448 genes, 1,86%	2,71896663
organelle assembly	GO:0070925	52 of 1128 genes, 4,61%	172 of 6448 genes, 2,67%	2,62893214
protein phosphorylation	GO:0006468	65 of 1128 genes, 5,76%	234 of 6448 genes, 3,63%	2,50031292
transcription from RNA polymerase I promoter	GO:0006360	27 of 1128 genes, 2,39%	68 of 6448 genes, 1,05%	2,45345734
organelle fission	GO:0048285	78 of 1128 genes, 6,91%	298 of 6448 genes, 4,62%	2,42945706
tRNA processing	GO:0008033	42 of 1128 genes, 3,72%	130 of 6448 genes, 2,02%	2,41116827

Table 3. Gene Ontology term enrichment for ZA-associated genes

GO Term	GO ID	GO Term Usage in Gene List	Genome Frequency of Use	-Log(p-value)
DNA-templated transcription, initiation	GO:0006352	20 of 370 genes, 5,41%	86 of 6448 genes, 1,33%	4,92445304
cytoskeleton organization	GO:0007010	34 of 370 genes, 9,19%	254 of 6448 genes, 3,94%	3,50863831
mRNA processing	GO:0006397	31 of 370 genes, 8,38%	219 of 6448 genes, 3,40%	3,50863831
transcription from RNA polymerase II promoter	GO:0006366	55 of 370 genes, 14,86%	526 of 6448 genes, 8,16%	3,48148606
mitotic cell cycle	GO:0000278	43 of 370 genes, 11,62%	372 of 6448 genes, 5,77%	3,27572413
RNA catabolic process	GO:0006401	24 of 370 genes, 6,5%	153 of 7166 genes, 2,1%	2,92811799
chromatin organization	GO:0006325	40 of 370 genes, 10,81%	345 of 6448 genes, 5,35%	2,88605665
regulation of cell cycle	GO:0051726	31 of 370 genes, 8,38%	269 of 6448 genes, 4,17%	2,78515615
organelle assembly	GO:0070925	24 of 370 genes, 6,5%	172 of 7166 genes, 2,4%	2,00480371

Table 4. Comparison of Gene Ontology term enrichments for H2A.Z, ZA and ZA-rII'-associated genes

GO Term (GO ID)	H2A.Z -Log(p-value)	ZA-rII' -Log(p-value)	ZA -Log(p-value)
cytoskeleton organization (GO:0007010)	20,853872	5,70114692	3,50863831
transcription from RNA polymerase II promoter (GO:0006366)	18,0305841	18,1007268	3,48148606
mitotic cell cycle (GO:0000278)	18	6,97469413	3,27572413
chromatin organization (GO:0006325)	15,0039263	15,6252517	2,88605665
cellular response to DNA damage stimulus (GO:0006974)	14,2448877	5,32239305	0

DNA repair (GO:0006281)	12,3214816	4,2541448	0
regulation of organelle organization (GO:0033043)	11,7825161	5,58502665	0
organelle fission (GO:0048285)	10,954677	2,42945706	0
mRNA processing (GO:0006397)	10,5751184	2,91364017	3,50863831
regulation of cell cycle (GO:0051726)	10,530178	3,39794001	2,78515615
Golgi vesicle transport (GO:0048193)	10,2533658	0	0
chromosome segregation (GO:0007059)	8,90308999	3,32790214	0
RNA catabolic process (GO:0006401)	7,4828041	3,58502665	2,92811799
protein targeting (GO:0006605)	7,37986395	0	0
protein complex biogenesis (GO:0070271)	6,94692156	5,39577395	0
tRNA processing (GO:0008033)	6,53313238	2,41116827	0
nucleus organization (GO:0006997)	6,10846254	0	0
DNA-templated transcription, initiation (GO:0006352)	5,9625735	6,16749109	4,92445304
chromatin silencing (GO:0006342)	5,75202673	3,18045606	0
peptidyl-amino acid modification (GO:0018193)	5,59516628	6,68824614	0
signaling (GO:0023052)	5,537602	0	0
nucleobase-containing compound transport (GO:0015931)	5,30980392	3,76955108	0
nuclear transport (GO:0051169)	5,30103	4,60730305	0
RNA splicing (GO:0008380)	5,27327279	0	0
organelle assembly (GO:0070925)	4,80410035	2,62893214	2,00480371
DNA-templated transcription, elongation (GO:0006354)	4,63638802	2,93181414	0
DNA replication (GO:0006260)	4,30715308	0	0
regulation of translation (GO:0006417)	3,61978876	0	0
response to chemical (GO:0042221)	3,58502665	0	0
histone modification (GO:0016570)	3,537602	6,02965312	0
organelle fusion (GO:0048284)	3,24412514	0	0
mitochondrion organization (GO:0007005)	3,06550155	2,72815839	0
transmembrane transport (GO:0055085)	2,9788107	3,18708664	0
DNA recombination (GO:0006310)	2,80410035	0	0
mitochondrial translation (GO:0032543)	2,7235382	0	0
regulation of DNA metabolic process (GO:0051052)	2,627088	0	0
protein phosphorylation (GO:0006468)	2,57675413	2,50031292	0
transcription from RNA polymerase III promoter (GO:0006383)	2,46344156	0	0
rRNA processing (GO:0006364)	2,31785492	0	0
endosomal transport (GO:0016197)	2,28399666	0	0

ribosome biogenesis (GO:0042254)	2,22841252	2,71896663	0
proteolysis involved in cellular protein catabolic process (GO:0051603)	2,03105032	0	0
protein acylation (GO:0043543)	0	3,23657201	0
transcription from RNA polymerase I promoter (GO:0006360)	0	2,45345734	0

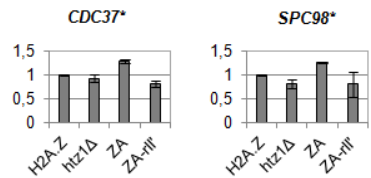
We used qRT-PCR in order to verify the impact of an enrichment of H2A.Z, ZA or ZA-rII' at gene promoters on the expression of genes involved in different biological processes. We randomly selected 3 genes involved in 10 different biological processes significantly enriched among H2A.Z-associated genes, but not or less enriched among ZA and ZA-rII'-associated genes. In order to determine if the H2A.Z C terminus regulates the expression level of those genes, the mRNA levels in *htz1Δ* mutant cells and *htz1Δ* cells expressing ZA or ZA-rII' were compared to the mRNA levels in *htz1Δ* complemented by a copy of *HTZ1*. In most cases, the *htz1Δ* mutant induced gene expression at a lower or higher rate than *HTZ1*-complemented *htz1Δ* cells (Figure 7), as expected since H2A.Z is involved in positive and negative regulation of gene expression (Meneghini *et al.*, 2003). In general, the expression of the tested genes is deregulated in cells containing ZA or ZA-rII', and the expression patterns are often similar to that of the *htz1Δ* mutant with regards to upregulation or downregulation of gene expression. Studies have reported that the H2A.Z C-terminal region is required for proper *GAL1* gene induction (Santisteban *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 2001; Larochelle and Gaudreau, 2003 and Wang *et al.*, 2011), and here we show that the H2A.Z C terminus is required for H2A.Z role in the regulation of the expression of several other genes involved in different biological processes. Furthermore, since the modification of the H2A.Z C-terminus could affect global gene expression in yeast, we interested ourselves in the essential genes whose expression could be regulated by H2A.Z. Nearly 30% of H2A.Z, ZA and ZA-rII'-associated genes are essential genes in yeast (Table 5).

Table 5. Comparison of Gene Ontology term enrichments for nonessential and essential H2A.Z, ZA and ZA-rII'-associated genes

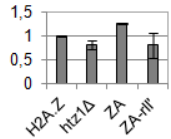
	Associated genes		Essential associated genes	
	Total	Unique to H2A.Z, ZA or ZA-rII'	Total	Unique to H2A.Z, ZA or ZA-rII'
H2A.Z	2240	1188 of 2240 genes (53,0%)	614 of 2240 genes (27,4%)	279 of 2240 genes (12,5%)
ZA	370	12 of 370 genes (3,2%)	113 of 370 genes (30,5%)	3 of 370 genes (0,8%)
ZA-rII'	1128	111 of 1128 genes (9,8%)	354 of 1128 genes (31,4%)	30 of 1128 genes (2,7%)

From those 614 essential H2A.Z-associated genes, 279 genes are uniquely associated with H2A.Z, suggesting that the expression of about 25% of essential genes in yeast is potentially regulated by the H2A.Z C-terminal region. Half of the genes we tested by qRT-PCR are essential genes (marked with *) and the expression of these essential genes is deregulated in *htz1Δ* mutant cells and in cells containing ZA or ZA-rII' when compared to H2A.Z containing cells (Figure 7). Thereby, we show that the modification of the H2A.Z C-terminal region affects the expression of nonessential and essential genes involved in several biological processes.

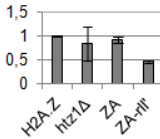
A Cytoskeleton organization



SPC98*

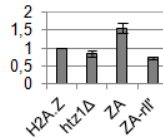


LST8*

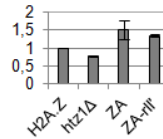


B Transcription from RNA polymerase II promoter

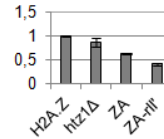
SPT8



SNT2

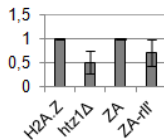


SSL1*

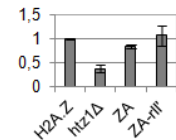


C Mitotic cell cycle

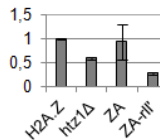
SCC2*



CDC10

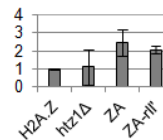


CDC53*

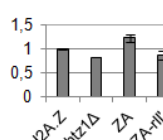


D DNA repair

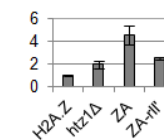
RTT107



RAD17

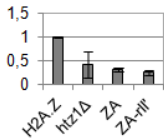


RAD28

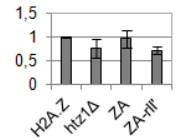


E Regulation of organelle organization

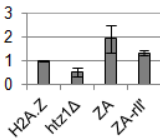
PSE1*



NUR1

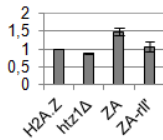


HIR3

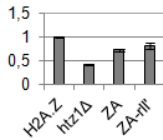


F mRNA processing

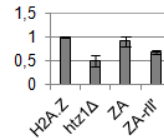
PIH1



PAP1*

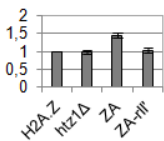


DCP1*

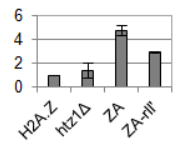


G Chromosome segregation

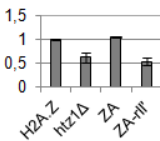
CHL1



MCM16

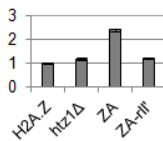


STS1*

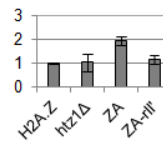


H Chromatin silencing

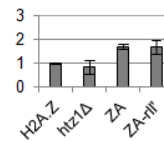
DIA2



CDC45*

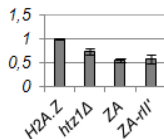


POL2*

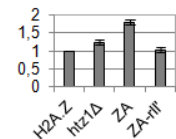


I RNA splicing

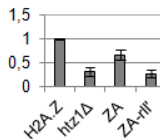
DBR1



PRP3*

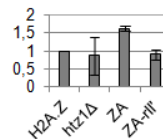


NAM8*

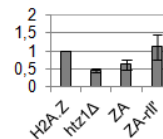


J rRNA processing

REX3



RRP5*



KRE33*

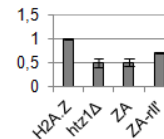


Figure 7. The modification of the H2A.Z C-terminal docking domain affects positively and negatively the expression of nonessential and essential genes in yeast qRT-PCR of the mRNA levels of the indicated genes, normalized to levels of *ACT1*. 3 genes involved in 10 biological processes were selected, including cytoskeleton organization (A), transcription from RNA polymerase II promoter (B), mitotic cell cycle (C), DNA repair (D), regulation of organelle organization (E), mRNA processing (F), chromosome segregation (G), chromatin silencing (H), RNA splicing (I) and rRNA processing (J). Essential genes are marked with an asterisk (*).

DISCUSSION

H2A.Z has a special function that differentiates the histone variant from the canonical H2A. The H2A.Z-containing nucleosome presents an extended acidic patch which is suggested to represent a binding platform for nuclear interacting partners (Suto *et al.*, 2000). In this study we have investigated the functional role of the H2A.Z C-terminal docking domain in its genomic localization and in the control of gene transcription.

First, we confirmed that the H2A.Z C-terminus is required for H2A.Z special function in *GALI* gene induction since the expression of ZA downregulates *GALI* gene expression to a further extent than in *htz1Δ* cells. As previously described, the expression of ZA-rII' restores the activation of the *GALI* gene suggesting that the H2A.Z C-terminal docking domain has a function reminiscent of a transcriptional activator (Larochelle and Gaudreau, 2003). Previous reports have shown that the ZA fusion protein is able to assemble into nucleosome particles but could not restore the special H2A.Z function in gene induction (Adam *et al.*, 2001 and Larochelle and Gaudreau, 2003), suggesting that the H2A.Z C-terminal region is not required for incorporation within chromatin but essential for its role in transcriptional activation. We confirmed that the H2A.Z C-terminus is required for H2A.Z role in resistance to genotoxic stress by assessing the ability of the H2A.Z derivatives to confer resistance to genotoxic stress induced by Hydroxyurea (HU), caffeine or methyl methanesulfonate (MMS). As expected, cells containing the ZA fusion protein exhibited retarded growth on all drugs, whereas the expression of the ZA-rII' fusion protein reversed the growth deficiency of *htz1Δ* mutant cells on HU and caffeine, but not on MMS-containing media. Hydroxyurea is a genotoxic stressor which arrests cells in S phase, whereas MMS is an alkylating agent which modifies both guanine and adenine to cause base mispairing and replication blocks, respectively (Beranek, 1990). DNA damage caused by alkylating agents is predominantly

repaired by the base excision repair (BER) and DNA alkyltransferases (Lindahl and Wood, 1999). Our Gene Ontology term enrichment analysis revealed that the mitotic cell cycle and DNA repair are biological processes significantly enriched among H2A.Z-associated genes, and thus, potentially H2A.Z-regulated processes. Both processes are less enriched among ZA-rII'-associated genes and DNA repair is not enriched among ZA-associated genes, indicating that the modification of the H2A.Z C-terminal region could affect the expression of genes involved in DNA repair to a greater extent than those involved in the mitotic cell cycle. Consequently, our expression assay shows that the expression of genes involved in the mitotic cell cycle is more or less affected by the modification of the H2A.Z C-terminus. On the other side, the expression of genes involved in DNA repair is greatly deregulated by the expression of ZA or ZA-rII' in *htz1Δ* cells compared to H2A.Z containing cells. In addition to its potential transcriptional role in, H2A.Z is involved in several steps of DNA damage repair, such as specific DNA resection and activation of DNA damage checkpoints, and sumoylation on lysines 125 and 133 in the H2A.Z C-terminal region is associated with double-stranded DNA breaks and damage repair.

Our genome-wide location analysis using ChIP-chip showed that H2A.Z, ZA and ZA-rII' are widely distributed across the yeast genome in a non-random manner and that H2A.Z enrichment peaks overlap ZA and ZA-rII' peaks suggesting that all three proteins follow the same non-random genomic distribution. As expected for the genome-wide location of H2A.Z, a first manual inspection of the data suggests that Z, ZA and ZA-rII' loci are predominantly located within promoter regions, but that the localization signal is globally diminished for the ZA fusion protein compared to H2A.Z and ZA-rII'. In addition to promoter regions, we also found that the H2A.Z distribution around centromeres and replication origins changes when its C-terminal region is modified, suggesting that the role of H2A.Z in chromosome segregation and DNA replication may be linked to its C-terminal docking domain. Moreover, we show that H2A.Z is enriched around the TSS of

HZAD genes, tRNA genes and snoRNA genes, suggesting that the role of H2A.Z in transcription is not limited to pol II-transcribed genes but also to pol III-transcribed genes. The wider distribution of H2A.Z and ZA-rII' at HZAD genes indicates that the H2A.Z C-terminal region may be important for reorganizing local chromatin structure or mediate specific interactions that lead to preventing Sir protein spreading in those regions. Supporting this idea, Wang et al. (2011) showed that the last 20 amino acids of the H2A.Z C terminus are required for the heterochromatin boundary function of H2A.Z at HMR and subtelomeres. H2A.Z is involved in the regulation of gene expression and in maintenance of heterochromatin-euchromatin boundaries. Consequently, our Gene Ontology term enrichment analysis revealed that transcription from RNA polymerase II, chromatin silencing and transcription from RNA polymerase III are significantly enriched biological processes among H2A.Z-associated genes.

At first, a manual inspection of the data suggested that Z, ZA and ZA-rII' loci are predominantly located within promoter regions compared with gene bodies. We then show that the genome-wide location of H2A.Z over gene promoters is dependent on its C-terminal region by profiling the H2A.Z, ZA and ZA-rII' localizations over yeast promoters using the Versatile Aggregate Profiler (VAP). The profiling shows that H2A.Z is enriched over yeast promoters compared to coding regions and we identified 2240 H2A.Z-associated genes which show at least a 2-fold enrichment of H2A.Z at the TSS and represent potential transcriptional H2A.Z-regulated genes. The ZA-rII' distribution is similar to that of H2A.Z over yeast promoters and 1128 ZA-rII'-associated genes were identified, showing that the transcriptional activating domain partially restores the localization at gene promoters in a genome-wide manner. Interestingly, the addition of the acidic transcriptional activating domain to the ZA fusion protein restores the localization at 696 genes compared to the ZA protein alone. We observe a decreased ZA signal over yeast promoters compared to H2A.Z and only 370 ZA-associated genes were identified, indicating that the specific genome-wide localization of H2A.Z at promoters is

dependent on its C-terminal region. Moreover, the ChIP-chip data not only reveals a decreased ZA occupancy at gene promoters but also an increased ZA occupancy in coding regions compared to H2A.Z, suggesting that the presence of the H2A C-terminal region forces the H2A.Z derivative to adopt a genome-wide distribution pattern similar to canonical histones. 1188 genes are only associated with H2A.Z, supporting the idea that the modification of the H2A.Z C-terminal region causes a loss of occupancy at promoters rather than a mislocalization of the protein. Furthermore, we propose that this loss of occupancy at gene promoters is SWR1-C independent since we observe a loss of the H2A.Z, ZA and ZA-rII' enrichment peaks and more uniform distributions over promoter and coding regions of the *DAL5* locus by ChIP-qPCR in the *swr1Δ* mutant strains. It is possible that SWR1-C efficiently deposits ZA as dimers with H2B into chromatin but dissociate thereafter due to weakened interactions with other nucleosomal histones, resulting in decreased ZA occupancy in nucleosomes over yeast promoters.

The 5'-end of a typical RNA polymerase II (RNAPII)-transcribed yeast gene is characterized by a NFR region upstream of the TSS, flanked by two well-positioned nucleosomes containing H2A.Z (Raisner *et al.*, 2005; Guillemette *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Millar *et al.*, 2006 and Albert *et al.*, 2007). We performed ChIP-chip using an alternative normalization method, on the ChIP input DNA, in order to verify if the observed enrichment peaks over the TSS of yeast genes aren't due to the nucleosome-free region in the promoter regions. As for the normalization on nucleosomal density, we observed a H2A.Z enrichment over yeast promoters and a ZA-rII' enrichment but at a lower level. Interestingly, we observe a small ZA peak over the TSS, but the ZA signal at the TSS is lower than in the coding region, confirming that the H2A.Z genome-wide location of H2A.Z over gene promoters is dependent on its C-terminal region. At a nucleosomal level, it is suggested that H2A.Z regulates gene transcription either by positioning and/or destabilizing nucleosomes (Guillemette *et al.*, 2005 and Zhang *et al.*,

2005). In yeast, the TSS resides just inside the +1 nucleosome border (Tsankov *et al.*, 2010), and H2A.Z regulates the precise positioning of this nucleosome (Guillemette *et al.*, 2005), which is essential for proper gene regulation (Jiang and Pugh, 2009). Guillemette *et al.* (2005) showed that the replacement of H2A.Z by H2A in cells induces a shift in the positioning of a nucleosome located over the transcription start site.

We compared the H2A.Z, ZA and ZA-rII' occupancies over yeast promoters to that of the total nucleosomes. Importantly, the H2A.Z enrichment peak overlap with the +1 nucleosome over yeast promoters as expected, but we observe a shifting of the ZA-rII' and ZA peaks toward the +2 nucleosome in a genome-wide manner. Taken together, our results support a model where the H2A.Z C-terminal region regulates the precise positioning of the +1 H2A.Z-containing nucleosome over yeast promoters and that the functional role of the H2A.Z C-terminal region in regulation of transcription encompasses, at least in part, a reorganization of the local chromatin structure.

In addition to its role in the positioning of the +1 nucleosome, it is suggested that H2A.Z regulates transcription by contacting components of the transcription machinery (Adam *et al.*, 2001). Moreover, it has been shown that the Mediator, SAGA, and Swi/Snf cannot be efficiently recruited to the GAL1 promoter in the absence of H2A.Z (Lemieux *et al.*, 2004). We show that the majority of H2A.Z-associated and ZA-rII'-associated genes occupy TATA-less and TFIID-enriched promoters. These results suggest that TFIID could be one the main downstream effectors of H2A.Z, and that the H2A.Z C-terminal region mediates interactions with similar downstream effectors than the Gal4 yeast activator. The mechanism by which transcriptional activating regions stimulate transcription is by recruitment of the transcriptional machinery to a target promoter

(Ptashne and Gann, 1997; Barberis and Gaudreau, 1998 and Keaveney and Struhl, 1998). *In vitro* and *in vivo* experiments have identified different targets of the well-characterized Gal4 yeast activator including TBP, TFIIB, the mediator complex, the Swi/Snf complex and the NuA4 acetyltransferase complex (Melcher and Johnson, 1995; Wu *et al.*, 1996; Koh *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2000; Jeong *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2001 and Neely *et al.*, 2002), which could potentially be downstream effectors of H2A.Z as well. H2A.Z marks promoters of inactive or weakly transcribed genes (Santisteban *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 2001; Guillemette *et al.*, 2005 et Hardy *et al.*, 2009). We observe that the H2A.Z and ZAR1' occupancies at gene promoters are inversely correlated to the RNA pol II occupancy, the expression level and transcription rates of all verified genes. Although further experiments will be carried out in order to identify direct interactors with the H2A.Z C-terminus, we propose that, once the histone variant is incorporated within chromatin at gene promoters, the H2A.Z C-terminal docking domain is required in order to form the acidic surface on the nucleosome and to be able to recruit the appropriate downstream effectors leading to transcriptional control. The fact that the addition of the transcriptional activating region rII' partially restored the *htz1Δ*-mediated growth defect, gene induction defect and loss of localization at gene promoters, may indicate that the H2A.Z C-terminal region could recruit certain transcription factors or coactivators that would lead to appropriate regulation of gene expression. We don't exclude the possibility that transcription factors might be recruited to promoter regions because the H2A.Z C-terminal docking domain mediates proper local chromatin architecture by positioning the +1 nucleosome. Thus, our results suggest that the functional role of the H2A.Z C-terminal region in regulation of transcription encompasses a reorganization of the local chromatin structure as well as contacting downstream effectors, and links H2A.Z dynamics at gene promoters and the transcriptional outcome.

In addition to its role in the regulation of gene expression, multiple studies have shown that H2A.Z is involved in several processes and that H2A.Z plays different biological

functions depending on the species (reviewed in Zlatanova et Thakar, 2008). We show that several biological processes are significantly enriched among H2A.Z-associated genes for which a role of H2A.Z has already been reported, for example DNA repair, chromosome segregation, chromatin silencing, and RNA splicing. Interestingly, most of the biological processes enriched among H2A.Z-associated genes were not or less enriched among ZA and ZA-rII'-associated genes, suggesting that the H2A.Z C-terminal docking domain has a potential role in the regulation of transcription of genes involved in several of these biological processes. Consequently, we observe that the expression of genes is deregulated in cells containing ZA or ZA-rII', and the expression patterns are often similar to that of the *htz1Δ* mutant with regards to upregulation or downregulation of gene expression. Since H2A.Z is involved in positive and negative regulation of transcription, it didn't strike us as a surprise that the modification of the H2A.Z C-terminal region resulted in up and downregulation of gene expression. We found that 614 of 2240 H2A.Z-associated genes are essential genes in yeast. Moreover, 279 genes are uniquely associated with H2A.Z, suggesting that the expression of about 25% of essential genes in yeast is potentially regulated by the H2A.Z C-terminal region. Consequently, the expression of these essential genes is deregulated in *htz1Δ* mutant cells and in cells containing ZA or ZA-rII' when compared to H2A.Z containing cells. Thereby, we show that the modification of the H2A.Z C-terminal region affects the expression of nonessential and essential genes involved in several biological processes and further experiments will be carried out in order to determine the cellular effect of such upregulation and downregulation of transcription on the different biological processes. H2A.Z has been shown to be involved in some of these processes previously, but its precise mechanisms and roles are not fully understood yet. Similarly to other histone variants and their associated factors, the deregulation of the expression of H2A.Z has been shown to cause several types of cancer, for example an overexpression of H2A.Z is reported to facilitate activation of estrogen-responsive genes and is associated with metastasis in breast cancer (Rangasamy, 2010 and Svtelis *et al.*, 2010). A reduced expression of H2A.Z is associated with genomic instability and development of colon

cancer (Dunican *et al.*, 2002). Importantly, we show that the H2A.Z genome-wide location at gene promoters is dependent on its C-terminal region and that the C terminus is required for proper gene expression of several nonessential and essential genes involved in different biological processes. Moreover, some of the tested genes in this study have human homologs whose expression deregulation has been associated with different human diseases. For example, we show that the expression of the *KRE33* gene is downregulated in *htz1Δ* cells and cells containing ZA or ZA-rII' compared to H2A.Z-containing cells. The essential *KRE33* gene encodes a conserved 18S rRNA cytosine acetyltransferase that modifies tRNAs and is required for biogenesis of the small ribosomal subunit (Pagé *et al.*, 2003 and Ito *et al.*, 2014). Its human homolog, *NAT10*, is implicated in several types of cancer and premature aging (Zhang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017). We propose that the modification of the H2A.Z C-terminal docking domain establishes an aberrant chromatin states over gene promoters and deregulates gene expression which could lead to global cellular effects. Thus, our data strongly suggest that the H2A.Z C-terminal region docking domain plays a global role of in regulation of gene transcription by coupling precise localization at gene promoters and the transcriptional outcome.

References

- Adam, M., Robert, F., Larochelle, M., and Gaudreau, L. (2001). H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol. Cell. Biol.*, 21:6270-6279.
- Albert, I., Mavrich, T. N., Tomsho, L. P., Qi, J., Zanton, S. J., Schuster, S. C. and Pugh, B. F. (2007). Translational and rotational settings of H2A.Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature.*, 446:572-576.
- Allis, C. D., Glover, C. V., Bowen, J. K., and Gorovsky, M. A. (1980). Histone variants specific to the transcriptionally active, amitotically dividing macronucleus of the unicellular eukaryote, *Tetrahymena thermophila*. *Cell*, 20:609-617.
- Barberis, A., and Gaudreau, L. (1998). Recruitment of the RNA polymerase II holoenzyme and its implications in gene regulation. *Biol. Chem.*, 379:1397-1405.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I. and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129:823-837.
- Basehoar, A. D., Zanton, S. J., and Pugh, B. F. (2004). Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell*, 116:699-709.
- Beranek, D. T. (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat. Res.*, 231:11-30.
- Boudreault, A. A., Cronier, D., Selleck, W., Lacoste, N., Utey, R. T., Allard, S., Savard, J., Lane, W. S., Tan, S., and Côté, J. (2003). Yeast enhancer of polycomb defines global Esa1-dependent acetylation of chromatin. *Genes Dev.*, 17:1415-1428.
- Brown, C. E., Howe, L., Sousa, K., Alley, S. C., Carrozza, M. J., Tan, S., and Workman, J. L. (2001). Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science*, 292:2333-2337.
- Bruce, K., Myers, F. A., Mantouvalou, E., Lefevre, P., Greaves, I., Bonifer, C., Tremethick, D. J., Thorne, A. W., and Crane-Robinson, C. (2005). The replacement histone H2A.Z in a hyperacetylated form is a feature of active genes in the chicken. *Nucleic acids research*, 33:5633-5639.
- Carr, A. M., Dorrington, S. M., Hindley, J., Phear, G. A., Aves, S. J., and Nurse, P. (1994). Analysis of a histone H2A variant from fission yeast: evidence for a role in chromosome stability. *Mol. Gen. Genet.*, 245:628-635.

- Clarkson, M. J., Wells, J. R. E., Gibson, F., Saint, R., and Tremethick, D. J. (1999). Regions of variant histone His2AvD required for *Drosophila* development. *Nature*, 399:694-697.
- Coulombe, C., Poitras, C., Nordell-Markovits, A., Brunelle, M., Lavoie, M. A., Robert, F., and Jacques, P. E. (2014). VAP: a versatile aggregate profiler for efficient genome-wide data representation and discovery. *Nucleic Acids Res.*, 42:485-493.
- Dhillon, N., and Kamakaka, R. T. (2000). A histone variant, Htz1p and a Sir1p-like protein, Esc2p, mediate silencing at HMR. *Mol. Cell*, 6:769-780.
- Dunican, D. S., McWilliam, P., Tighe, O., Parle-McDermott, A., and Croke, D. T. (2002). Gene expression differences between the microsatellite instability (MIN) and chromosomal instability (CIN) phenotypes in colorectal cancer revealed by high-density cDNA array hybridization. *Oncogene*, 21: 3253-3257.
- Durant, M., and Pugh, B. F. (2007). NuA4-directed chromatin transactions throughout the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Mol. Cell Biol.*, 27:5327-5335.
- Eberharter, A., and Becker, P. B. (2004). ATP-dependent nucleosome remodelling: factors and functions. *J. Cell Sci.*, 117:3707-3711.
- Gelato, K. A., and Fischle, W. (2008). Role of histone modifications in defining chromatin structure and function. *Biol. Chem.*, 389:353-363.
- Gévry, N., Chan, H. M., Laflamme, L., Livingston, D. M., and Gaudreau, L. (2007). p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev.*, 21:1869-1881.
- Guillemette, B., Bataille, A. R., Gévry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F., and Gaudreau, L. (2005). Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol.*, 3, e384.
- Guillemette, B., and Gaudreau, L. (2006). Reuniting the contrasting functions of H2A.Z. *Biochem. Cell Biol.*, 84:528-535.
- Halley, J. E., Kaplan, T., Wang, A. Y., Kobor, M. S., and Rine, J. (2010). Roles for H2A.Z and its acetylation in GAL1 transcription and gene induction, but not GAL1-transcriptional memory. *PLoS Biol.*, 8:e1000401.
- Hardy, S., Jacques, PE, Gévry, N., Forest, A., Fortin, ME, Laflamme, L., Gaudreau, L. and Robert, F. (2009). The euchromatic and heterochromatic landscapes are shaped by antagonizing effects of transcription on H2A.Z deposition. *PLoS Genet.*, 5(10): e1000687. doi:10.1371/journal.pgen.1000687.
- Hardy, S., and Robert, F. (2010). Random deposition of histone variants: A cellular mistake or a novel regulatory mechanism? *Epigenetics*, 5:368-372.

Henikoff, S., and Ahmad, K. (2005). Assembly of variant histones into chromatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21:133-153.

Huisinga, K. L., and Pugh, B. F. (2004). A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell*, 13:573-585.

Ito, S., Akamatsu, Y., Noma, A., Kimura, S., Miyauchi, K., Ikeuchi, Y., Suzuki, T., and Suzuki, T. (2014). A single acetylation of 18S rRNA is essential for biogenesis of the small ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 289:26201-26212.

Jackson, J. D., Falciano, V. T., and Gorovsky, M. A. (1996). A likely histone H2A.F/Z variant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biochem. Sci.*, 21:466-467.

Jeong, C. J., Yang, S. H., Xie, Y., Zhang, L., Johnson, S. A., and Kodadek, T. (2001). Evidence that Gal11 protein is a target of the Gal4 activation domain in the mediator. *Biochemistry*, 40:9421-9427.

Jiang, C., and Pugh, B. F. (2009). Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat. Rev. Genet.*, 10:161-172.

Jin, C., and Felsenfeld, G. (2007). Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev.*, 21:1519-1529.

John, S., Sabo, P. J., Johnson, T. A., Sung, M. H., Biddie, S. C., Lightman, S. L., Voss, T. C., Davis, S. R., Meltzer, P. S., Stamatoyannopoulos, J. A., and Hager, G. L. (2008). Interaction of the glucocorticoid receptor with the chromatin landscape. *Mol. Cell*, 29:611-624.

Keaveney, M., and Struhl, K. (1998). Activator-mediated recruitment of the RNA polymerase II machinery is the predominant mechanism for transcriptional activation in yeast. *Mol. Cell*, 1:917-924.

Koh, S. S., Ansari, A. Z., Ptashne, M., and Young, R. A. (1998). An activator target in the RNA polymerase II holoenzyme. *Mol. Cell*, 1:895-904.

Krogan, N. J., Baetz, K., Keogh, M. C., Datta, N., Sawa, C., Kwok, T. C., Thompson, N. J., Davey, M. G., Pootoolal, J., Hughes, T. R., Emili, A., Buratowski, S., Hieter, P., and Greenblatt, J. F. (2004). Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:13513-13518.

Krogan, N. J., Keogh, M. C., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O. W., Ding, H., Haw, R. A., Pootoolal, J., Tong, A., Canadien, V., Richards, D. P., Wu, X., Emili, A., Hughes, T. R.,

- Buratowski, S., and Greenblatt, J. F. (2003). A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of histone H2A variant Htz1. *Mol. Cell*, 12:1565-1576.
- Ladurner, A. G., Inouye, C., Jain, R., and Tijan, R. (2003). Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol. Cell*, 11:365-376.
- Larochelle, M., and Gaudreau, L. (2003). H2A.Z has a function reminiscent of an activator required for preferential binding to intergenic DNA. *EMBO J.*, vol. 22, no. 17, 4512-4522.
- Leach, T.J., Mazzeo, M., Chotkowski, H. L., Madigan, J. P., Wotring, M. G. and Glaser, R. L. (2000). Histones H2A.Z is widely bunonrandomly distributed in chromosome of *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, 30: 23267-72.
- Lemieux, K., and Gaudreau, L. (2004). Targeting of Swi/Snf to the yeast GAL1 UASG requires the Mediator, TAF IIs, and RNA polymerase II. *EMBO J.*, 23:4040-4050.
- Li, B., Pattenden, S. G., Lee, D., Gutiérrez, J., Chen, J., Seidel, C., Gerton, J., and Workman, J. L. (2005). Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 18385-18390.
- Li, Q., Liu, X., Jin, K., Lu, M., Zhang, C., Du, X., and Xing, B. (2017). NAT10 is upregulated in hepatocellular carcinoma and enhances mutant p53 activity. *BMC Cancer*, 17:605.
- Lindahl, T., and Wood, R. D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science*, 286:1897-1905.
- Luk, E., Vu, N. D., Patteson, K., Mizuguchi, G., Wu, W. H., Ranjan, A., Backus, J., Sen, S., Lewis, M., Bai, Y., and Wu, C. (2007). Chz1, a nuclear chaperone for histone H2A.Z. *Mol. Cell*, 25:357-368.
- Matangkasombut, O., and Buratowski, S. (2003). Different sensitivities of bromodomain factors 1 and 2 to histone H4 acetylation. *Mol. Cell*, 11:353-363.
- Mavrich, T. N., Jiang, C., Ioshikhes, I. P., Li, X., Venters, B. J., Zanton, S. J., Tomsho, L. P., Qi, J., Glaser, R. L., Schuster, S.C., Gilmour, D. S., Albert, I. and Pugh, B. F. (2008). Nucleosome organization in the *Drosophila* genome. *Nature*, 453:358-362.
- Melcher, K., and Johnson, S. A. (1995). GAL4 interacts with TATA-binding protein and coactivators. *Mol. Cell. Biol.*, 15:2839-2848.
- Meneghini, M. D., Wu, M., and Madhani, H. D. (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell*, 112:725-736.

Millar, C. B., Xu, F., Zhang, K. and Grunstein, M. (2006). Acetylation of H2A.Z Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast. *Genes Dev.*, 20:711-722.

Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W. H., Sen, S., and Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2A.Z variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science*, 303:343-348.

Neely, K. E., and Workman, J. L. (2002). Histone acetylation and chromatin remodeling: which comes first? *Mol. Genet. Metab.*, 76:1-5.

Pagé, N., Gérard-Vincent, M., Ménard, P., Beaulieu, M., Azuma, M., Dijkgraaf, G. J., Li, H., Marcoux, J., Nguyen, T., Dowse, T., Sdicu, A. M., and Bussey, H. (2003). A *Saccharomyces cerevisiae* genome-wide mutant screen for altered sensitivity to K1 killer toxin. *Genetics*, 163:875-894.

Park, J. M., Kim, H. S., Han, S. J., Hwang, M. S., Lee, Y. C., and Kim, Y. J. (2000). In vivo requirement of activator-specific binding targets of mediator. *Mol. Cell. Biol.*, 20:8709-8719.

Park, Y. J., Chodaparambil, J. V., Bao, Y., McBryant, S. J., and Luger, K. (2005). Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding. *J. Biol. Chem.*, 280:1817-1825.

Ptashne, M., and Gann, A. (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature*, 386:569-577.

Raisner, R. M., Hartley, P. D., Meneghini, M. D., Bao, M. Z., Liu, C. L., Schreiber, S. L., Rando, O. J., and Madhani, H.D. (2005). Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell*, 123:233-248.

Rangasamy, D. (2010). Histone variant H2A.Z can serve as a new target for breast cancer therapy. *Curr. Med. Chem.*, 17: 3155-3161.

Ren, B., Robert, F., Wyrick, J. J., Aparicio, O., Jennings, E. G., et al. (2000). Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science*, 290:2306-2309.

Santisteban, M. S., Kalashnikova, T., and Smith, M. M. (2000). Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell*, 103:411-422.

Suto, R. M., Clarkson, M. J., Tremethick, D. J., and Luger, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat. Struct. Biol.*, 7:1121-1124.

- Svotelis, A., Gévry, N., Grondin, G., and Gaudreau, L. (2010). H2A.Z overexpression promotes cellular proliferation of breast cancer cells. *Cell cycle*, 9:364-370.
- Tsankov, A. M., Thompson, D. A., Socha, A., Regev, A., and Rando, O. J. (2010). The role of nucleosome positioning in the evolution of gene regulation. *PLoS Biol.*, 8:e1000414.
- Wang, A. Y., Aristizabal, M. J., Ryan, C., Krogan, N. J., and Kobor, M. S. (2011). Key functional regions in the histone variant H2A.Z C-terminal docking domain. *Mol. Cell. Biol.*, 31:3871-3884.
- Wu, W. H., Alami, S., Luk, E., Wu, C. H., Sen, S., Mizuguchi, G., Wei, D., and Wu, C. (2005). Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12:1064-1071.
- Wu, Y., Reece, R. J., and Ptashne, M. (1996). Quantitation of putative activator-target affinities predicts transcriptional activating potentials. *EMBO J.*, 15:3951-3963.
- Zhang, H., Hou, W., Wang, H. L., Liu, H. J., Jia, X. Y., Zheng, X. Z., Zou, Y. X., Li, X., Hou, L., McNutt, M. A., and Zhang, B. (2014). GSK-3 β -regulated N-acetyltransferase 10 is involved in colorectal cancer invasion. *Clin. Cancer Res.*, 20:4717-4729.
- Zhang, H., Roberts, D. N., and Cairns, B. R. (2005). Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell*, 123, 219-231.
- Zhang, X., Liu, J., Yan, S., Huang, K., Bai, Y., and Zheng, S. (2015). High expression of N-acetyltransferase 10: a novel independent prognostic marker of worse outcome in patients with hepatocellular carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 8:14765-14771.
- Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T., and Henikoff, S. (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature*, 456:125-129.
- Zlatanova, J., and Thakar, A. (2008). H2A.Z: view from the top. *Structure*, 16:166-179.

CHAPITRE 4

RESULTATS

4.1 Application de la méthode BioID à l'étude des protéines interagissant avec la région C-terminale de H2A.Z

La méthode BioID a été développée par l'équipe de Brian Burke de l'institut de biologie médicale de Singapour afin d'identifier les interacteurs et les protéines à proximité d'une protéine d'intérêt dans les cellules de mammifères (Roux *et al.*, 2012). La méthode BioID offre des avantages importants par rapport aux autres méthodes d'étude des interactions protéine-protéine; par exemple, cette méthode permet d'identifier des interactions transitoires ou faibles, mais aussi d'étudier des structures cellulaires insolubles (Varnaité et MacNeill, 2016). Par l'identification de nouvelles interactions protéiques ces dernières années, cette nouvelle méthode a déjà eu un impact majeur sur notre compréhension des réseaux et processus cellulaires (pour un résumé des applications de la méthode BioID, voir la Tableau 4.1).

Tableau 4.1 Les applications de la méthode BioID chez différentes espèces.

Structures, voies de signalisation ou organismes étudiés	Organisme ou type cellulaire exprimant la fusion	Protéine d'intérêt fusionnée à BirA*	Référence
Lamina nucléaire	Cellules de mammifères	Lamine A (LaA)	Roux <i>et al.</i> (2012)
		Lamine A, progérine	Chojnowski <i>et al.</i> (2015)
		Lamine B1 (LMNB1), macroH2A1	Fu <i>et al.</i> (2015)
Complexe du pore nucléaire	Cellules de mammifères	Nup53 (composante du complexe Nup53) et Nup43, Nup85, Nup107, Nup133 et Nup160 (composantes du complexe-Y)	Kim <i>et al.</i> (2014)
Centrosome et interface du centrosome (cil primaire)	Cellules de mammifères	CEP120	Comartin <i>et al.</i> (2013)
		PLK4, CEP192, CEP63, CEP152, CPAP, CCDC67, CCDC14 et KIAA0753	Firat-Karalar <i>et al.</i> (2014)
		58 protéines appâts	Gupta <i>et al.</i> (2015)
Jonctions cellulaires	Cellules de mammifères	ZO-1	Van Itallie <i>et al.</i> (2013)
		E-cadhérine	Van Itallie <i>et al.</i> (2014)
		Occludine, Claudine-4	Fredriksson <i>et al.</i> (2015)
		MarvelD3	Steed <i>et al.</i> (2014)
		α -caténine	Ueda <i>et al.</i> (2015)
Autophagie	Cellules de mammifères	TBC1D14	Lamb <i>et al.</i> (2016)
Voies de signalisation	Cellules de mammifères	Voie Hippo : 19 protéines appâts	Couzens <i>et al.</i> (2013)
		MEKK3	Zhou <i>et al.</i> (2015)
		PPP2R5C	Cheng <i>et al.</i> (2015)
		CALML5 et SFN	Sun <i>et al.</i> (2015)
Dégradation des ARNm non-sens	Cellules de mammifères	UPF1, UPF2 et SMG5	Schweingruber <i>et al.</i> (2016)
Voie de dégradation ubiquitine dépendante	Cellules de mammifères	β -TrCP1 et β -TrCP2	Coyaud <i>et al.</i> (2015)
		Usp12	Jahan <i>et al.</i> (2016)
Dégradation de protéines dans la mitochondrie	Cellules de mammifères	ClpP	Cole <i>et al.</i> (2015)
Facteurs de transcription oncogéniques	Cellules de mammifères	Fusion EWS-Flt-1	Elzi <i>et al.</i> (2014)
		c-MYC	Dingar <i>et al.</i> (2015)
Nucléosome	Cellules de mammifères	Histones H2B et H3	Lambert <i>et al.</i> (2015)
Médiateur	Cellules de mammifères	Sous-unités Med4, Med20 et Med23	Lambert <i>et al.</i> (2015)
Dystrophie cornéenne de Schnyder	Cellules de mammifères	HMG-CoA-réductase	Schumacher <i>et al.</i> (2015)
Cytokinèse	Cellules de mammifères	ULK3	Caballe <i>et al.</i> (2015)
Bilobe (complexe Hook)	<i>Trypanosoma brucei</i>	TbMORN1	Morriswood <i>et al.</i> (2013)
		TbSAS-4	Hu <i>et al.</i> (2015)
		TbPLK	McAllaster <i>et al.</i> (2015)
Complexe membranaire interne	<i>Toxoplasma gondii</i>	ISP3 et AC2	Chen <i>et al.</i> (2015)
		TgCDPK3	Gaji <i>et al.</i> (2015)
Lamina nucléaire	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Lamine NE81	Batsios <i>et al.</i> (2016a) et Batsios <i>et al.</i> (2016b)
Infections virales	<i>VIH-1</i>	Polyprotéine Gag	Ritchie <i>et al.</i> (2015) et Le Sage <i>et al.</i> (2015)
		Vpu	Kueck <i>et al.</i> (2015)
	Virus Epstein-Barr (EBV)	LMP1	Holthusen <i>et al.</i> (2015)
Infections bactériennes	<i>Chlamydia psittaci</i>	SINC	Mojica <i>et al.</i> (2015)
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Syntaxin	Kabeiseman <i>et al.</i> (2014)

La biotine ligase de type sauvage (BirA) de *E. coli* reconnaît une séquence spécifique appelée BAT (*biotin acceptor tag*) sur sa protéine cible, l'acétyl-CoA carboxylase.

Également, la biotine ligase BirA agit en tant que répresseur transcriptionnel de l'opéron codant les protéines permettant la biosynthèse de la biotine (Chapman-Smith et Cronan, 1999). L'enzyme BirA utilise la biotine et l'ATP pour générer un intermédiaire hautement réactif, le biotinoyl-5'-AMP (bioAMP). Cet intermédiaire réagit ensuite avec une lysine de la séquence cible de BirA afin de former un lien amide entre la biotine et le résidu lysine, relâchant l'AMP (Chapman-Smith et Cronan, 1999 et Lane *et al.*, 1964). BirA possède une haute affinité pour l'intermédiaire biotinoyl-5'-AMP et le retient dans son site actif jusqu'au moment où l'enzyme rencontre son substrat. La forme mutante de la biotine ligase de *E. coli*, BirA*, porte la mutation R118G dans son site actif qui diminue de deux fois son affinité pour l'intermédiaire biotinoyl-5'-AMP et qui libère l'intermédiaire de façon prématurée (Choi-Rhee *et al.*, 2004 et Kwon et Beckett, 2000). Cette version mutée de BirA est appelée « promiscuous » puisque l'intermédiaire biotinoyl-5'-AMP reste hautement réactif et peut réagir avec des lysines accessibles de protéines aux alentours de BirA*. La version « promiscuous » BirA* est à la base de la méthode BioID puisque dans cette méthode, la protéine de fusion de BirA* avec la protéine d'intérêt permet de biotinyler les protéines aux alentours de la protéine d'intérêt et d'identifier ses interacteurs potentiels. Puisque cette méthode est dépendante de la proximité des protéines, les interacteurs potentiels doivent se trouver dans une zone accessible pour l'intermédiaire biotinoyl-5'-AMP. Roux *et al.* (2012) ont initialement établi que le rayon de biotinylation de BirA* est d'environ 20 à 30 nm. Suite à des études de la structure du complexe du pore nucléaire, le rayon de biotinylation a été précisé et établi à environ 10 nm (Kim *et al.*, 2014). Quoique la valeur du rayon de biotinylation de BirA* semble variable selon la protéine à l'étude, ces valeurs de rayon sont suffisantes pour affirmer que les protéines biotinylées représentent des interacteurs directs, mais aussi des interacteurs indirects potentiels.

Lorsque la protéine de fusion entre l'enzyme BirA* et la protéine d'intérêt a été obtenue et intégrée dans la lignée cellulaire désirée, l'expression de la protéine de fusion est induite

et le milieu de culture est supplémenté de biotine (50 μ M) afin d'induire la biotinylation des protéines à proximité de la protéine de fusion avec BirA*. Après une période d'incubation appropriée, les cellules sont récoltées, les protéines sont extraites et les protéines biotinylées sont purifiées en utilisant la streptavidine puisque la liaison de haute affinité entre la biotine et la streptavidine est un des liens covalents les plus forts identifiés. Finalement, la spectrométrie de masse est utilisée afin d'identifier les protéines biotinylées (Figure 4.1).

Les résultats obtenus jusqu'ici suggèrent que la région C-terminale de H2A.Z est nécessaire pour l'induction de la transcription, mais ne semble pas être impliquée dans l'incorporation et l'évincement de H2A.Z de la chromatine au niveau des promoteurs. Nous suggérons un modèle dans lequel H2A.Z, une fois incorporé aux promoteurs, doit posséder sa région C-terminale avec son «docking domain» afin de former la surface acide dans le nucléosome et pour pouvoir recruter des coactivateurs de la transcription et induire l'expression des gènes. La méthode BioID (*proximity-dependent biotin identification*), développée récemment, est basée sur la biotinylation de protéines interactrices par une biotine ligase que l'on peut ensuite purifier grâce à la haute affinité de la streptavidine pour la biotine et identifier les protéines biotinylées par spectrométrie de masse (Roux *et al.*, 2012).

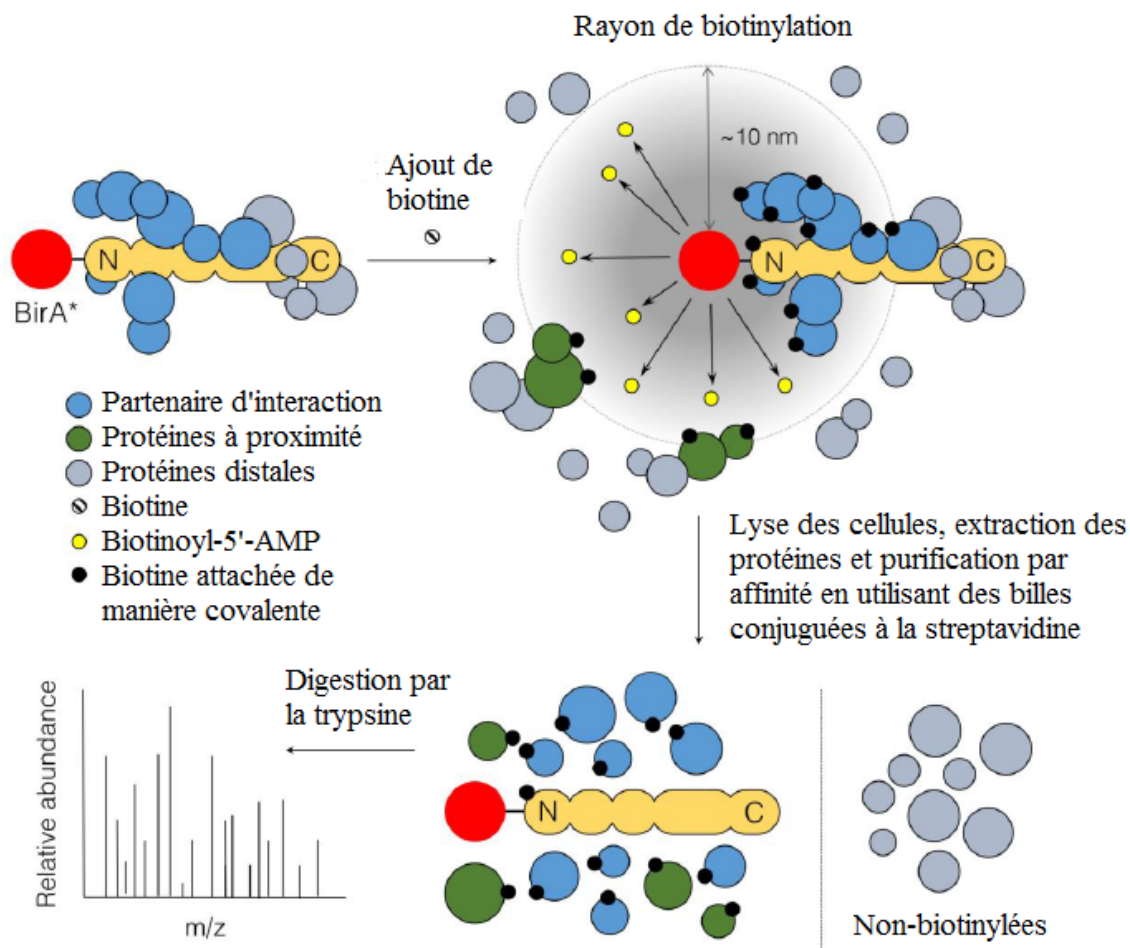


Figure 4.1 Représentation schématique de l'application de la méthode BioID. La protéine de fusion entre la biotine ligase mutée BirA* et la protéine d'intérêt est exprimée dans le type cellulaire ou l'organisme désiré. L'ajout de biotine induit la biotinylation sur les lysines disponibles des protéines à proximité de la protéine de fusion, dans un rayon de 10 à 30 nm. Les protéines sont extraites des cellules dans des conditions stringentes et les protéines biotinylées sont purifiées par affinité pour la streptavidine couplée à des billes. Les protéines interactrices potentielles sont identifiées par spectrométrie de masse (Figure tirée et adaptée de Vanaité et MacNeill, 2016).

Cette méthode permet d'identifier les protéines qui interagissent de manière directe, indirecte ou transitoire avec une protéine d'intérêt. Dans le domaine de la chromatine, la méthode BioID a été utilisée afin d'étudier les partenaires d'interaction des histones H2B et H3 dans les cellules de mammifères (Lambert *et al.*, 2014). Cette approche

protéomique permettra d'identifier les protéines interagissant avec le nucléosome contenant H2A.Z, mais aussi les protéines à proximité dans son contexte cellulaire normal.

4.2 L'enzyme mutée BirA* (mutation R118G) perd sa spécificité et biotinyle les protéines avoisinantes chez la levure

La méthode BioID ayant été développée et majoritairement appliquée dans les cellules de mammifères, elle est toutefois appliquée également dans quelques autres organismes modèles tels que *Trypanosoma brucei*, *Toxoplasma gondii* et *Dictyostelium discoideum* (Morriswood *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2015; McAllaster *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Gaji *et al.*, 2015; Batsios *et al.*, 2016a et Batsios *et al.*, 2016b). Dans cette étude, nous explorons la possibilité de l'application de la méthode BioID dans l'organisme modèle *Saccharomyces cerevisiae*. Dans ce but, nous avons généré une version « promiscuous » BirA* par mutagenèse dirigée à partir d'un vecteur d'expression de BirA optimisé pour la levure (Figure 4.2a). L'arginine (codon CGC) en position 118 a été échangée pour une glycine (codon GGT). La protéine de type sauvage, nommée BirA-WT, ainsi que la version « promiscuous » BirA* possèdent une étiquette 6x histidine (6xHIS) en N-terminal, sont exprimées à partir du promoteur constitutif ADH1 et ont été intégrées dans le génome d'une souche mutante *htz1Δ* au locus *URA3*. Le niveau d'expression de BirA-WT et BirA* peut être adressé par un immunobuvardage de type Western en utilisant un anticorps spécifique pour l'étiquette 6xHIS (Figure 4.2b). Les protéines biotinylées peuvent être visualisées par immunobuvardage de type Western en utilisant la streptavidine couplée à la peroxydase de raifort (streptavidine-HRP) qui lie directement les protéines biotinylées sur la membrane de difluorure de polyvynyle (PVDF). Grâce à l'agent streptavidine-HRP, il est possible de comparer les niveaux de biotinylation des

protéines par BirA-WT et par BirA*, et ainsi, vérifier si la mutation R118G est effective sur le plan de la biotinylation.

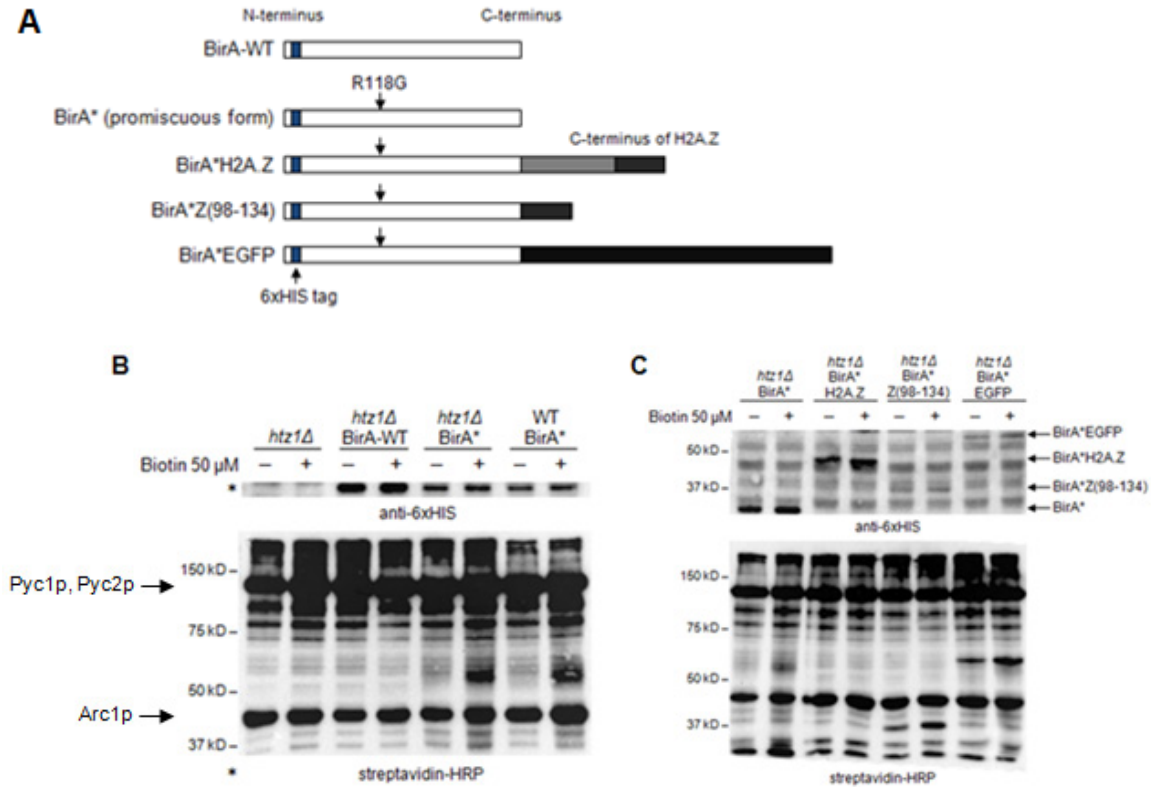


Figure 4.2 L'enzyme mutée BirA* perd sa spécificité et biotinye les protéines avoisinantes. (A) Représentation schématique des protéines de fusion avec l'enzyme BirA* afin d'identifier les partenaires d'interaction avec les nucléosomes contenant H2A.Z. Les fusions portent une étiquette 6xHIS en N terminus. (B) BirA-WT et BirA* ont été intégrées dans une souche *htz1Δ* ou de type sauvage comme contrôle. Les souches sont cultivées dans un milieu riche (YPD) pour 48 heures soit avec ou sans ajout de biotine exogène (50 μM). Les niveaux de protéines BirA-WT et BirA* ont été déterminés par un immunobuvardage de type Western en utilisant un anticorps spécifique pour l'étiquette 6xHIS. Le niveau de protéines biotinylées est déterminé à l'aide de l'agent streptavidine-HRP. (C) Les protéines de fusions ont été intégrées dans la souche *htz1Δ* et les souches sont cultivées dans un milieu riche (YPD) pour 48 heures soit avec ou sans ajout de biotine exogène (50 μM). Les niveaux des protéines de fusion ont été déterminés par un immunobuvardage de type Western en utilisant un anticorps spécifique pour l'étiquette 6xHIS. Le niveau de protéines biotinylées est déterminé à l'aide de l'agent streptavidine-HRP.

Dans une souche *htz1Δ* sans biotine ligase, il est possible d'observer les protéines biotinylées de manière endogène (Figure 4.2b). Un niveau modeste de biotinylation est observé pour BirA-WT lorsque comparé au niveau des protéines biotinylées par BirA*. En général, une stimulation de la biotinylation est observée lorsque de la biotine exogène (50 μ M) est ajoutée au milieu de culture. Ces résultats démontrent que la mutation R118G que porte la version « promiscuous » BirA* augmente la biotinylation des protéines chez *S. cerevisiae*. Aussi, le niveau de biotinylation semble régulé par la concentration de biotine libre disponible.

4.3 Biotinylation par la protéine de fusion BirA*H2A.Z

L'étape suivante consiste en déterminer si BirA* peut être utilisée comme outil afin d'identifier les protéines interagissant avec les nucléosomes contenant H2A.Z. Pour ce faire, une fusion entre notre protéine d'intérêt, H2A.Z, et l'enzyme BirA* est réalisée par assemblage de Gibson et nommée BirA*H2A.Z (Figure 4.2a). Puisque la région C-terminale de H2A.Z forme la surface acide en collaboration avec l'histone H2B et que cette plateforme serait importante pour le recrutement de protéines nucléaires, nous avons placé l'enzyme BirA* en N-terminal de H2A.Z afin d'éviter de gêner les interactions potentielles. Des fusions en N- et en C-terminal ont été observées dans les différentes études utilisant la méthode BioID selon les protéines d'intérêt étudiées et la localisation de domaines importants dans ces protéines. Parfois, il est préférable de conduire l'expérience avec des fusions en N- et en C-terminal en parallèle, afin de s'assurer d'identifier tous les interacteurs potentiels. Une fusion entre l'enzyme BirA* et la région C-terminale de H2A.Z seule a également été réalisée et nommée BirA*Z(98-134). Aussi, une fusion contrôle a été réalisée, soit la fusion de l'enzyme BirA* avec le gène

rapporteur EGFP. Entre autres, cette fusion contrôle, nommée BirA*EGFP, permettra d'identifier les protéines qui sont biotinylées de manière endogène suite à la spectrométrie de masse. Ces fusions comportent une étiquette 6xHIS en N-terminal de BirA*, sont exprimées à partir du promoteur constitutif ADH1 et sont également intégrées dans le génome d'une souche mutante *htz1Δ* au locus *URA3*. Le niveau des fusions dans la souche *htz1Δ* est vérifié par immunobuvardage de type Western avec un anticorps anti-6xHIS (Figure 4.2c). Dans ces conditions, la fusion BirA*H2A.Z semble exprimée à un niveau similaire à BirA* tandis que les fusions BirA*Z(98-134) et BirA*EGFP semblent exprimées à un niveau moindre. Il serait intéressant de comparer le niveau d'expression de la fusion BirA*H2A.Z au niveau d'expression de la protéine H2A.Z endogène. Le niveau de protéine de fusion devrait être comparable au niveau de la protéine d'intérêt endogène, car une surproduction de la fusion avec BirA* peut mener à une mauvaise localisation de la fusion, une biotinylation de protéines non spécifique et l'identification de faux positifs lors de la spectrométrie de masse. Les patrons de biotinylation des protéines par les différentes fusions sont adressés par un immunobuvardage de type Western en utilisant l'agent streptavidine-HRP (Figure 4.2c). Dans tous les cas, les protéines biotinylées de manière endogène peuvent être visualisées et sont biotinylées au même niveau. Les patrons de biotinylation des fusions BirA*H2A.Z et BirA*Z(98-134) sont similaires, mais diffèrent des patrons de biotinylation de BirA* et BirA*EGFP. Alors que l'enzyme BirA* et la fusion BirA*EGFP devraient se trouver dans le cytoplasme, les fusions BirA*H2A.Z et BirA*Z(98-134) devraient être localisées dans le noyau. Ainsi, ses fusions entrent en contact avec différents ensembles de protéines expliquant les différents patrons de biotinylation.

Il est également suggéré de vérifier la localisation de la protéine de fusion par rapport à la localisation de la protéine endogène. Il faut noter qu'une localisation appropriée de la protéine de fusion n'indique pas si sa fonction a été conservée. La fusion BirA*H2A.Z

devrait être incorporée dans la chromatine et présenter le même patron de localisation aux promoteurs que la protéine H2A.Z endogène. Afin de vérifier la localisation nucléaire de la fusion BirA*H2A.Z, une co-immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée. Cette fusion possède une étiquette HA dans la région N-terminale de H2A.Z, ce qui permet d'immunoprécipiter la fusion à l'aide d'un anticorps spécifique pour l'étiquette HA. Le patron de distribution de BirA*H2A.Z a été comparé au patron de distribution de H2A.Z et H2A au locus *DAL5* (Figure 4.3).

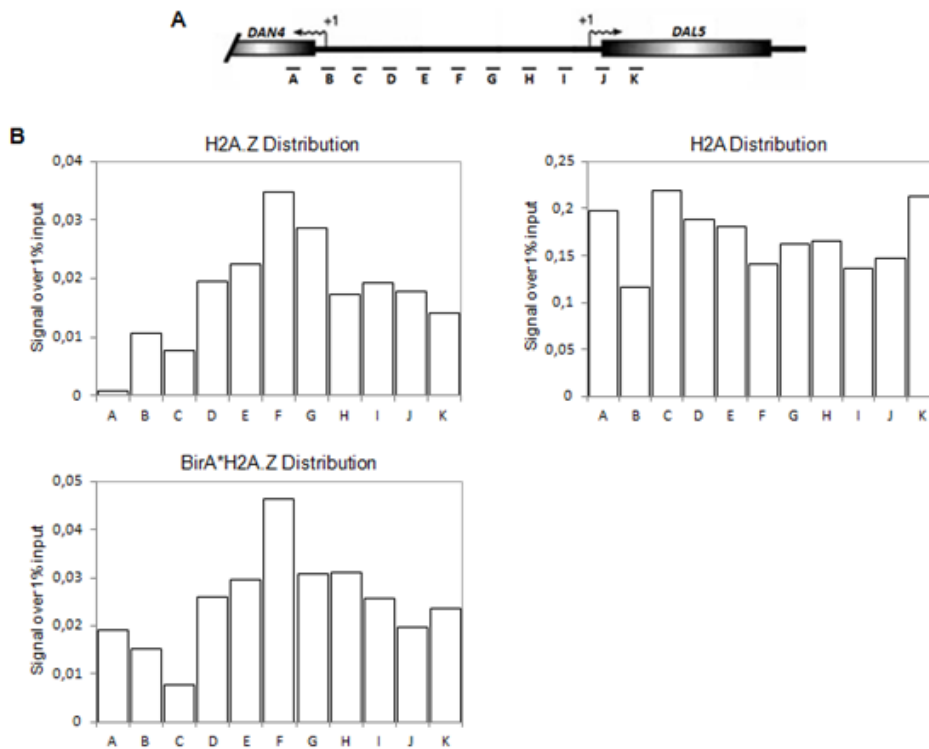


Figure 4.3 La fusion BirA*H2A.Z est incorporée dans la chromatine au locus *DAL5*
(A) Représentation schématique du locus *DAL5*. Les régions amplifiées par PCR quantitative sont représentées. **(B)** Des souches *htz1Δ* complémentées par les constructions H2A.Z, H2A ou BirA*H2A.Z ont été utilisées pour réaliser des co-immunoprécipitations de la chromatine (ChIP) grâce à l'étiquette HA afin de vérifier les distributions de celles-ci au locus *DAL5* dans des conditions non induites. Les enrichissements des histones au locus ont été quantifiés par PCR quantitative et les signaux ont été normalisés par rapport à 1% de l'ADN total.

H2A.Z présente un enrichissement au niveau du promoteur, alors que la distribution de H2A est plutôt uniforme. Le patron de distribution de la fusion BirA*H2A.Z au locus *DAL5* présente également un enrichissement au niveau du promoteur et son patron de distribution est similaire à celui de H2A.Z. Nous concluons ainsi que la fusion BirA*H2A.Z est importée dans le noyau par les chaperonnes d'histones et est incorporée dans la chromatine au niveau des promoteurs. Même si la protéine de fusion BirA*H2A.Z présente une localisation appropriée, il serait intéressant de vérifier si la fonction de H2A.Z dans l'activation de la transcription est conservée, en réalisant un simple essai d'induction du gène *GAL1* par la fusion BirA*H2A.Z par exemple. Ces résultats suggèrent que la protéine de fusion BirA*H2A.Z peut être ciblée au noyau, incorporée spécifiquement dans la chromatine au niveau des promoteurs et présente un patron de biotinylation différent de l'enzyme BirA* cytoplasmique.

4.4 Régulation temporelle de la biotinylation

Il a été observé, dans les cellules de mammifères comme dans nos premiers essais chez la levure, que le niveau de biotinylation semble régulé par la concentration de biotine libre disponible. Afin d'étudier la modulation de la biotinylation par l'enzyme BirA* et la fusion BirA*H2A.Z selon la concentration de biotine libre, nous avons observé le niveau de biotinylation des protéines en général pour différents temps suite à l'induction de la biotinylation par l'ajout de biotine exogène (50 μ M) dans le milieu de culture (Figures 4.4a et 4.4b). Le niveau de protéines biotinylées augmente constamment en parallèle avec le temps d'exposition à la biotine. Cet effet semble atteindre une saturation dans les 36 à 48h et révèle une accumulation de protéines biotinylées dépendante du temps. Aussi, les

niveaux d'expression de l'enzyme BirA* et de la fusion BirA*H2A.Z semblent constants tout au long du 48h de biotinylation. Ainsi, le niveau de biotinylation est dépendant du temps d'exposition à la biotine libre, mais il serait intéressant de vérifier si le niveau de biotinylation est également dépendant de la concentration de biotine libre. Pour adresser cette question, nous avons augmenté la concentration de biotine libre de 50 à 100 μM dans le milieu de culture et vérifié le niveau de biotinylation des protéines par BirA*H2A.Z dans le temps (Figure 4.4c). Sur 24h de culture, le niveau de biotinylation est plus élevé pour la concentration de biotine 100 μM par rapport à la concentration de 50 μM , indiquant que le niveau de biotinylation des protéines est également dépendant de la concentration de biotine libre disponible. Afin d'optimiser les conditions de culture et le niveau de biotinylation, nous avons choisi une concentration de biotine de 100 μM et une durée d'exposition à la biotine de 12h. Ainsi, ces résultats indiquent qu'il est possible de contrôler l'accès à la biotine et qu'il est possible de réguler le niveau de biotinylation par BirA* et BirA*H2A.Z de manière temporelle.

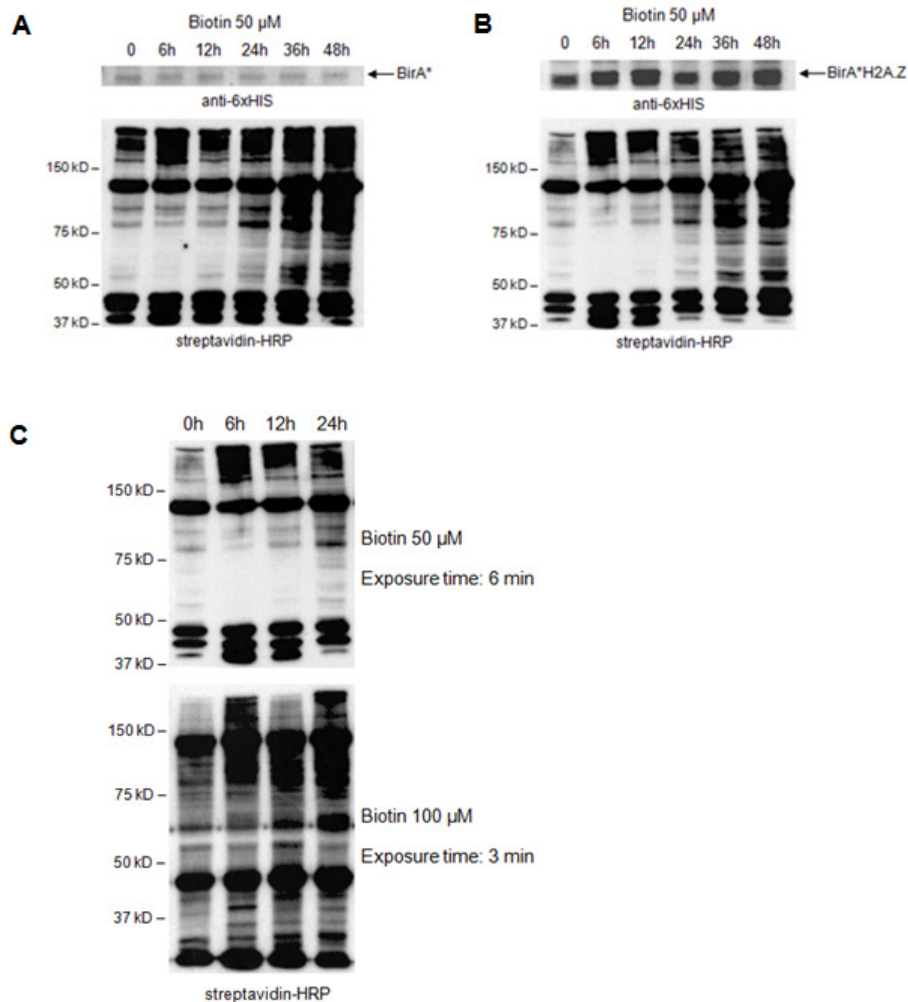


Figure 4.4 Régulation temporelle et par la concentration de biotine dans le milieu de la biotinylation chez la levure. (A) et (B) Afin d'étudier la modulation de la biotinylation par BirA* et BirA*H2A.Z, la biotine (50 μ M) est ajoutée au milieu de culture et les cellules sont récoltées à différents points dans le temps. Les niveaux des protéines BirA* et BirA*H2A.Z ont été déterminés par un immunobuvardage de type Western en utilisant un anticorps spécifique pour l'étiquette 6xHIS. (C) Comparaison du niveau de biotinylation par BirA*H2A.Z lorsque la biotine est ajoutée à une concentration finale de 50 μ M ou 100 μ M dans le milieu de culture. Les cellules sont récoltées à différents points dans le temps. Le niveau de protéines biotinylées est déterminé à l'aide de l'agent streptavidine-HRP.

4.5 Optimisation du protocole de purification des protéines biotinylées chez la levure

Suite à l'optimisation des conditions de culture et de biotinylation pour l'application de la méthode BioID chez la levure, nous avons procédé à l'optimisation des étapes subséquentes, soient l'extraction des protéines totales et la purification des protéines biotinylées. À noter que l'optimisation de ces étapes chez la levure n'est pas encore au point. Les cellules sont lysées dans des conditions stringentes et les protéines biotinylées sont purifiées en utilisant des billes couplées à la streptavidine. Un immunobuvardage de type Western en utilisant l'agent streptavidine-HRP permet de vérifier l'efficacité de la purification des protéines biotinylées (Figure 4.5). La comparaison du niveau de biotinylation dans les échantillons « inputs » et dans les échantillons de protéines purifiées permet d'affirmer que les étapes de la purification des protéines biotinylées grâce aux billes couplées à la streptavidine sont efficaces. Les prochaines étapes d'optimisation de la purification impliqueraient de vérifier la quantité de protéines obtenue suite à la purification et de vérifier si certaines protéines interactrices potentielles pourraient être identifiées par immunobuvardage de type Western. Par exemple, la fusion BirA*H2A.Z étant incorporée dans les nucléosomes et interagissant avec les autres histones, nous pourrions vérifier si, suite à la purification des protéines biotinylées, il serait possible d'identifier des histones biotinylées.

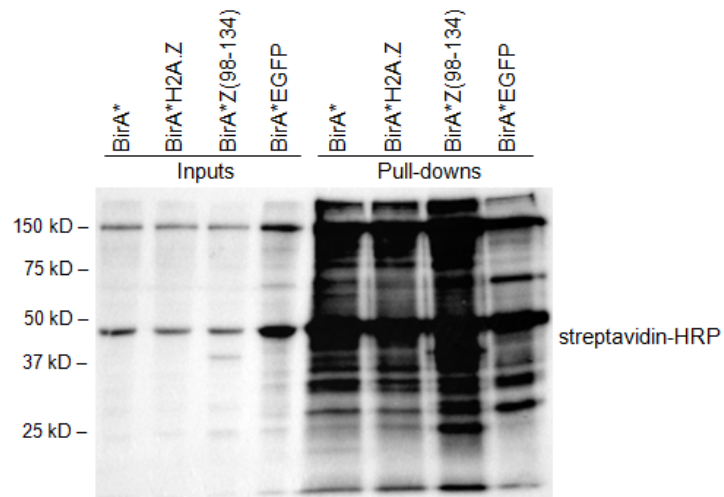


Figure 4.5 Efficacité de la purification des protéines biotinylées. Les protéines biotinylées sont purifiées à l'aide de billes couplées à la streptavidine. Le niveau de protéines biotinylées dans les échantillons inputs 1% et purifiés sont analysés par immunobuvardage de type Western en utilisant l'agent streptavidine-HRP.

CHAPITRE 5

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Il est évident que H2A.Z possède une fonction spéciale qui différencie fonctionnellement le variant d'histone de l'histone canonique H2A. De manière surprenante, les structures des nucléosomes contenant H2A.Z ou H2A sont assez similaires, mais leurs structures diffèrent dans quelques régions clés. Il y a plusieurs années, des équipes de recherche ont commencé à investiguer comment les quelques différences structurales entre H2A.Z et H2A pouvaient expliquer leurs différences fonctionnelles. Une des divergences principales entre les structures de H2A.Z et H2A se trouve dans le domaine d'amarrage dans la région C-terminale qui montre seulement 60% de séquence d'identité entre les deux histones. Le domaine d'amarrage de H2A.Z présente une extension de résidus acides qui s'étend sur l'histone H2B dans le nucléosome et qui est suggéré agir comme plateforme de recrutement pour des protéines nucléaires (Suto *et al.*, 2000). Depuis cette découverte, les chercheurs ont investigué le rôle fonctionnel de ce domaine d'amarrage et les interactions potentielles avec cette région spécifique du nucléosome contenant H2A.Z.

Nos travaux sur le domaine d'amarrage dans la région C-terminale de H2A.Z visaient à étudier le rôle de ce domaine dans deux aspects de la biologie de H2A.Z chez *Saccharomyces cerevisiae*, soient sa localisation au niveau du nucléosome +1 dans les promoteurs des gènes à l'échelle du génome ainsi que dans la régulation de la transcription génique. Nous avons défini trois objectifs principaux de maîtrise, soient l'implication de la région C-terminale de H2A.Z dans sa localisation spécifique aux promoteurs à l'échelle du génome, l'implication de ce domaine d'amarrage dans le contrôle positif et négatif de la transcription génique de manière générale chez la levure

et finalement, l'identification des différentes protéines nucléaires pouvant interagir avec les nucléosomes contenant H2A.Z et mener à la régulation de la transcription.

Premièrement, grâce à la méthode ChIP-chip nous avons déterminé la localisation des protéines H2A.Z, ZA et ZA-rII' à l'échelle du génome. En plus de sa localisation attendue dans les régions promotrices, nous avons démontré que H2A.Z est également enrichi autour des centromères, des origines de réplication et aux sites d'initiation de la transcription des gènes HZAD, des gènes codants des ARNt et des petits ARN nucléaires. De manière intéressante, les patrons de localisations des protéines ZA et ZA-rII' différaient de H2A.Z pour ces éléments, suggérant que la région C-terminale de H2A.Z est également importante pour sa localisation à d'autres régions spécifiques sur les chromosomes que les promoteurs. De plus, la distribution plus large de H2A.Z et de ZA-rII' au niveau du site d'initiation de la transcription des gènes HZAD suggère que la région C-terminale de H2A.Z serait importante pour la réorganisation locale de la structure de la chromatine ou pour contacter certaines protéines spécifiques menant à la prévention de l'étalement de l'hétérochromatine par les protéines Sir dans ces régions. Nous avons aligné les signaux de ChIP-chip pour tous les gènes chez la levure par rapport au site d'initiation (TSS) de la transcription afin de démontrer que la localisation spécifique de H2A.Z aux promoteurs est dépendante de sa région C-terminale à l'échelle du génome, puisque le signal de la protéine ZA au niveau du TSS est diminué par rapport à celui de H2A.Z. Nous avons identifié 2240 gènes présentant un enrichissement de H2A.Z de deux fois ou plus ($\log_2 \text{ratio} \geq 1$) au niveau du site d'initiation de la transcription, et nous les avons appelés des gènes associés à H2A.Z. 1128 gènes sont associés à ZA-rII' et 370 gènes sont associés à ZA. Puisque 1188 gènes sont uniquement associés à H2A.Z, nous avons conclu que la modification de la région C-terminale de H2A.Z cause une diminution de l'incorporation au niveau du promoteur. De plus, nous avons démontré que cette diminution de l'incorporation de ZA au niveau du promoteur

est indépendante du complexe SWR1-C. Grâce à une méthode de normalisation alternative, soit en comparant les signaux d'immunoprécipitations aux signaux de l'ADN total, nous avons démontré que la diminution du signal de ZA au TSS n'est pas due à la région dépourvue de nucléosomes se trouvant dans les promoteurs. De plus, cette méthode de normalisation nous a permis de démontrer que contrairement au pic de H2A.Z positionné au nucléosome +1, les pics d'enrichissement de ZA et ZA-rII' sont décalés vers le nucléosome +2 à l'échelle du génome. Les résultats suggèrent que la région C-terminale de H2A.Z est responsable de réguler le positionnement précis des nucléosomes +1 contenant H2A.Z au niveau des promoteurs chez la levure. Ainsi, nous proposons que le rôle de la région C-terminale de H2A.Z dans la régulation de la transcription englobe, en partie du moins, une réorganisation locale de la structure de la chromatine.

En deuxième lieu, en plus de son rôle dans le positionnement du nucléosome +1, on pense que H2A.Z régule la transcription en contactant des composantes de la machinerie de transcription (Adam *et al.*, 2001), telles que le Médiateur, le complexe SAGA et le complexe Swi/Snf (Lemieux *et al.*, 2004). Afin d'investiguer le rôle de la région C-terminale de H2A.Z dans le contrôle global de la transcription génique, nous avons déterminé à quel type de promoteur H2A.Z est associé. Nous avons déterminé que la majorité des gènes associés à H2A.Z et ZA-rII' possèdent des promoteurs sans boîte TATA et enrichis en TFIID. Nos résultats suggèrent que TFIID pourrait être une des protéines effectrices principales des nucléosomes contenant H2A.Z. Également, étant donné que H2A.Z et ZA-rII' occupent des promoteurs présentant les mêmes caractéristiques, nous proposons que la région C-terminale de H2A.Z puisse médier des interactions avec des protéines effectrices semblables à la région rII' provenant de l'activateur de la transcription Gal4 chez la levure. Quelques cibles de cet activateur de la transcription sont connues, telles que TBP, TFIIB, le Médiateur, le complexe Swi/Snf et

le complexe acétyltransférase NuA4 (Melcher et Johnson, 1995; Wu *et al.*, 1996; Koh *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2000; Jeong *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2001 et Neely *et al.*, 2002), qui pourraient également représenter des cibles potentielles des nucléosomes contenant H2A.Z. De plus, il a été démontré que H2A.Z occupe les promoteurs de gènes inactifs ou très peu transcrits (Santisteban et al., 2000; Adam et al., 2001; Guillemette *et al.*, 2005 et Hardy *et al.*, 2009) et nous avons démontré que les niveaux d'incorporation de H2A.Z et ZA-rII' aux promoteurs sont inversement corrélés au niveau de liaison de l'ARN polymérase II aux promoteurs, au niveau d'expression et au taux de transcription des gènes chez la levure. Puisque la région d'activation de la transcription rII' permet de compléter au moins partiellement les déficits de croissance, d'induction de la transcription et de localisation aux promoteurs associés au mutant *htz1Δ*, nous suggérons que la région C-terminale de H2A.Z permet de recruter certains facteurs de transcription ou coactivateurs menant à une régulation appropriée de la transcription. Ainsi, nous proposons qu'une fois le variant d'histone incorporé dans la chromatine aux promoteurs, la région C-terminale de H2A.Z est nécessaire afin de former la surface acide d'interaction sur le nucléosome et de recruter les protéines effectrices appropriées menant à la régulation de la transcription. D'un autre côté, nous n'excluons pas la possibilité que les facteurs de transcription puissent être recrutés aux régions promotrices car la région C-terminale de H2A.Z permet une architecture locale adéquate de la chromatine et un positionnement précis du nucléosome +1. De manière plus générale, nous avons déterminé que les gènes associés et potentiellement régulés de manière transcriptionnelle par H2A.Z sont impliqués dans plusieurs processus biologiques, par exemple l'organisation du cytosquelette, la transcription des promoteurs reconnus par l'ARN polymérase II et le cycle cellulaire mitotique, mais que la plupart de ces processus ne sont pas ou moins enrichis pour les gènes associés à ZA ou ZA-rII'. Conséquemment, nous avons démontré que l'expression de gènes impliqués dans ces processus est dérégulée dans des cellules contenant ZA ou ZA-rII' de manière similaire au mutant *htz1Δ*, suggérant que la modification de la région C-terminale de H2A.Z affecte l'expression des gènes de manière globale. De manière intéressante, nous avons déterminé que 614 gènes

essentiels sont des gènes associés à H2A.Z et nous avons déterminé que l'expression de gènes essentiels est également dépendante de la région C-terminale de H2A.Z. Ainsi, nous proposons que la modification de la région C-terminale de H2A.Z établit une structure aberrante de la chromatine au niveau des promoteurs qui dérégule l'expression des gènes de manière globale et qui pourrait affecter plusieurs processus biologiques. En somme, nos résultats suggèrent que la région C-terminale de H2A.Z joue un rôle global dans la régulation de la transcription en couplant la localisation précise du variant d'histone aux promoteurs et l'état transcriptionnel du gène correspondant.

Finalement, nous avons démontré que la région C-terminale de H2A.Z est nécessaire pour l'expression de plusieurs gènes non essentiels et essentiels et nous suggérons un modèle dans lequel H2A.Z, une fois incorporé aux promoteurs, doit posséder sa région C-terminale afin de former la surface acide sur le nucléosome et pouvoir recruter des coactivateurs de la transcription menant au contrôle de l'expression des gènes. Ainsi, nous avons appliqué la méthode de protéomique BioID (proximity-dependent biotin identification) chez la levure afin d'identifier les protéines interagissant avec le nucléosome contenant H2A.Z, mais aussi les protéines à proximité dans son contexte cellulaire normal. La méthode BioID est basée sur la biotinylation de protéines interactrices par une biotine ligase que l'on peut ensuite purifier grâce à la haute affinité de la streptavidine pour la biotine et identifier les protéines biotinylées par spectrométrie de masse (Roux *et al.*, 2012). Cette méthode permet d'identifier les protéines qui interagissent de manière directe, indirecte ou transitoire avec une protéine d'intérêt. Premièrement, nous avons démontré que l'enzyme mutée BirA* (mutation R118G) perd sa spécificité et biotinye les protéines avoisinantes chez la levure. Ensuite, nous avons démontré que le patron de biotinylation de la protéine de fusion BirA*H2A.Z diffère des patrons de BirA* et du contrôle BirA*EGFP. Puisque BirA* et BirA*EGFP devraient présenter des localisations cytoplasmiques alors que BirA*H2A.Z devrait avoir une

localisation nucléaire, il est attendu que ces protéines interagissent avec différents des ensembles de protéines résultant en différents patrons de biotinylation. De plus, nous avons démontré que la fusion BirA*H2A.Z est incorporée dans la chromatine et qu'elle montre le même patron de distribution que H2A.Z au niveau du locus *DAL5*. Également, le niveau de biotinylation augmente constamment en parallèle avec le temps d'exposition à la biotine ainsi qu'avec l'augmentation de la concentration de biotine. Finalement, nous avons procédé à l'optimisation des étapes subséquentes, soient l'extraction des protéines totales et la purification des protéines biotinylées, mais l'optimisation de ces étapes chez la levure n'est pas encore au point. Nous avons vérifié l'efficacité de la purification des protéines biotinylées grâce aux billes couplées à la streptavidine et nous avons réalisé une analyse par spectrométrie de masse en duplicata pour les interactomes de la protéine BirA*H2A.Z et BirA*EGFP afin d'identifier les protéines biotinylées et purifiées. L'analyse des données de la spectrométrie de masse a révélé que nos protéines d'intérêt ont été identifiées seulement dans leurs échantillons respectifs, indiquant par exemple que BirA*EGFP a respecté sa localisation cytoplasmique et que H2A.Z n'a pas été identifié dans son interactome. Malheureusement, une quantité insuffisante de protéines ont été identifiées pour considérer notre essai de spectrométrie de masse valide. La protéine GFP a été identifiée 12 fois dans notre essai de spectrométrie de masse (peptide count = 12 pour n=1 et n=2) et la protéine H2A.Z a été identifiée seulement 5 fois (peptide count =5) alors que normalement on recherche une identification d'environ 30 fois ou plus de notre protéine d'intérêt. Donc, ces résultats indiquent que nous n'avons pas suffisamment de protéines suite à la purification des protéines biotinylées. Nous avons démontré que toutes les étapes de l'application de la méthode BioID fonctionne jusqu'à l'identification des protéines biotinylées par spectrométrie de masse. Dans un avenir rapproché, il serait possible d'optimiser davantage le protocole de BioID afin d'identifier les protéines interagissant avec le nucléosome contenant H2A.Z.

En somme, les travaux présentés dans ce mémoire apportent une compréhension améliorée de la biologie de H2A.Z, plus spécifiquement de la fonction de sa région C-terminale. Notre étude permet un rapprochement entre la localisation de H2A.Z aux promoteurs et son implication dans la régulation de la transcription et accorde à la région C-terminale de H2A.Z un rôle transcriptionnel global chez la levure.

CHAPITRE 6

PERSPECTIVES

Notre étude sur le domaine d'amarrage dans la région C-terminale de H2A.Z a permis d'adresser d'importantes questions concernant la biologie de H2A.Z et les résultats obtenus entraînent plusieurs avenues d'exploration qu'il serait intéressant d'investiguer.

Premièrement, nos travaux se basent sur l'utilisation de protéines de fusion dérivées de H2A.Z dont la région C-terminale au complet a été remplacée par la région correspondante de H2A. Nous avons démontré que la fonction de localisation aux promoteurs ainsi que la fonction de régulation de la transcription de H2A.Z résident dans sa région C-terminale, mais il serait intéressant d'identifier les acides aminés de cette région qui sont essentiels à la fonction de H2A.Z. Maintenant que nous avons attribué un rôle en transcription au domaine d'amarrage entier de H2A.Z, il serait possible de réaliser des mutations ponctuelles de certains acides aminés clés, par exemple les acides aminés qui divergent entre les séquences des domaines d'amarrage de H2A.Z et H2A, et vérifier l'effet des mutations sur la fonction de H2A.Z. Il serait également possible d'utiliser un système inverse à celui utilisé dans cette étude, soit de considérer la séquence de l'histone canonique H2A comme référence et modifier sa séquence pour en analyser les effets. Par exemple, il serait possible d'induire des mutations ponctuelles dans la région C-terminale de H2A et vérifier s'il est possible d'obtenir un phénotype similaire à celui de H2A.Z.

En deuxième lieu, nous avons démontré que le remplacement de la région C-terminale de H2A.Z par la région correspondante de H2A entraîne une diminution de l'incorporation de ZA aux promoteurs et que cette diminution est indépendante du complexe SWR1-C. Il est possible que le complexe SWR1-C incorpore ZA dans la chromatine de manière efficace, mais que le dimère ZA/H2B se dissocie rapidement du à un affaiblissement des interactions avec les autres histones, ce qui mènerait à une diminution de la présence de ZA dans les nucléosomes des promoteurs. Wang et al. (2011) ont démontré que la troncation de la région C-terminale de H2A.Z d'aussi peu que 10 acides aminés occasionne une diminution de l'incorporation du variant d'histone dans la chromatine, mais la liaison des protéines tronquées en C-terminal au complexe SWR1 est conservée. Par contre, ils ont démontré que la troncation de la région C-terminale de H2A.Z jusqu'à l'acide aminé 104 dans la région M6 occasionne la perte de l'interaction avec le complexe SWR1 ainsi qu'avec l'histone H2B. Puisque les différents degrés de troncation de la région C-terminale de H2A.Z semblent avoir des effets différents sur la liaison de H2A.Z à SWR1-C et sur son niveau d'incorporation de H2A.Z dans la chromatine, nous suggérons que la liaison de H2A.Z au complexe SWR1 et son incorporation dans la chromatine pourraient constituer deux événements indépendants. Il serait intéressant d'étudier l'implication des différentes régions du C-terminal de H2A.Z et les rôles distincts que pourraient jouer les acides aminés dans la liaison à SWR1-C et dans l'incorporation dans la chromatine. Dans notre modèle, il serait intéressant de vérifier la capacité de liaison des protéines chimères au complexe SWR1 en réalisant des essais de co-immunoprécipitations de différentes sous-unités du complexe SWR1 avec H2A.Z, ZA et ZA-rII'.

En plus de la liaison de H2A.Z avec le complexe SWR1-C, plusieurs interactions clés avec les nucléosomes contenant H2A.Z semblent essentielles à la fonction de H2A.Z. Afin de déterminer par quels mécanismes précis H2A.Z régule la transcription, il serait important d'identifier les partenaires d'interaction directs avec la région C-terminale de

H2A.Z. C'est dans ce but que nous avons appliqué la méthode BioID chez la levure et que nous prévoyons de continuer l'optimisation de la purification des protéines biotinylées et l'identification par spectrométrie de masse. Une fois le protocole optimisé, nous pourrions analyser les protéines interactrices, par exemple en les classant selon leur localisation et leur fonction. La localisation nucléaire des interacteurs potentiels peut être adressée par microscopie à fluorescence ou plus précisément par co-immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Aussi, il est possible de séparer les interacteurs selon leur fonction, par exemple en identifiant les protéines associées à la réparation des dommages à l'ADN, à la transcription ou au remodelage de la chromatine. Ensuite, dans les catégories, il est possible de sélectionner les protéines avec la plus haute abondance, indiquant probablement un interacteur potentiel important avec la protéine d'intérêt. Il est possible que des protéines non caractérisées à ce jour et interagissant avec H2A.Z soient identifiées par la spectrométrie de masse. Une caractérisation de ces protéines impliquerait une vérification de leur localisation cellulaire et de leur colocalisation avec H2A.Z aux promoteurs par ChIP-qPCR. Le mode de liaison d'une protéine non caractérisée aux nucléosomes ainsi que sa spécificité pour les nucléosomes contenant H2A.Z pourraient être adressés par des expériences de co-précipitations et par modélisation de la structure 3D. De plus, l'analyse de la séquence de ces interacteurs non caractérisés permettrait d'identifier des motifs de séquence indiquant de potentielles fonctions biologiques. Finalement, il est possible de sélectionner des interacteurs avec un haut niveau de confiance en combinant la méthode BioID avec une technique alternative de protéomique quantitative, telle que le SILAC (Chen *et al.*, 2015) ou le SWATH (Gillet *et al.*, 2012).

En plus de son rôle dans la régulation de la transcription génique, il a été démontré que H2A.Z est impliqué dans plusieurs autres processus biologiques et que ce variant joue différents rôles selon les espèces. En plus de sa localisation dans les régions promotrices,

nous avons démontré que H2A.Z est localisé à d'autres éléments particuliers des chromosomes ainsi qu'à d'autres éléments transcrits. De manière intéressante, la modification de la région C-terminale affectait les patrons d'enrichissement de H2A.Z à la plupart de ces éléments chromosomiques. Le patron d'enrichissement de H2A.Z autour des centromères et des origines de réplication change lorsque sa région C-terminale est modifiée. Il est possible que les rôles de H2A.Z dans la ségrégation des chromosomes et dans la réplication de l'ADN soient liés à sa région C-terminale. Il serait intéressant d'étudier l'implication de la région C-terminale de H2A.Z dans le bon fonctionnement de la ségrégation des chromosomes et dans la réplication de l'ADN en ce qui concerne son effet sur la structure locale de la chromatine et/ou le potentiel recrutement de protéines effectrices. De plus, nous avons montré que H2A.Z est enrichi au site d'initiation de la transcription des gènes HZAD, des gènes codant des ARNt et des petits ARN nucléaires, et que ces patrons d'enrichissement changent également lorsque la région C-terminale de H2A.Z est modifiée. Nos résultats suggèrent que le rôle de la région C-terminale de H2A.Z en transcription n'est pas seulement limité aux gènes transcrits par l'ARN polymérase II, mais s'applique également aux gènes transcrits par l'ARN polymérase III. À partir des résultats obtenus dans cette étude, il serait intéressant d'étudier l'implication de la région C-terminale dans les divers rôles de H2A.Z et comment la fonction de H2A.Z est liée à sa diversité de localisation génomique.

Finalement, nous avons démontré que les gènes associés à H2A.Z sont impliqués dans différents processus biologiques, tels que la transcription, le cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN, le silençage de la chromatine et l'épissage des ARN. La modification de la région C-terminale de H2A.Z affecte l'expression de gènes non essentiels et essentiels impliqués dans ces processus. Il serait intéressant de réaliser un séquençage de l'ARN à haut débit (RNA-seq) afin de comparer les transcriptomes des souches *htz1Δ* complémentées par H2A.Z, ZA ou ZA-rII' et d'étudier l'implication de la

région C-terminale de H2A.Z dans la régulation transcriptionnelle de la cellule. De plus, nous avons observé que la modification de la région C-terminale de H2A.Z affecte l'expression de plusieurs gènes de manière positive ou négative. Il serait intéressant d'investiguer les effets d'une telle augmentation ou diminution de l'expression de certains gènes sur le déroulement des différents processus biologiques, et ultimement, sur le fonctionnement global de la cellule. De manière similaire aux autres histones, il a été démontré qu'une dérégulation de H2A.Z pouvait être impliquée dans le développement de certains cancers. Par exemple, une surexpression de H2A.Z facilite l'activation des gènes cibles de l'oestrogène et est associée à un stade métastatique du cancer du sein (Rangasamy, 2010 et Svtelis *et al.*, 2010). Une expression réduite de H2A.Z est associée à l'instabilité génomique et au développement du cancer du côlon (Dunican *et al.*, 2002). Dans cette étude, nous démontrons que la modification de la région C-terminale de H2A.Z entraîne des changements d'expression génique pouvant affecter plusieurs processus biologiques. De plus, certains gènes testés dans cette étude possèdent des homologues chez l'humain dont la dérégulation de l'expression a été associée à différentes maladies humaines. Nous proposons que la modification de la région C-terminale de H2A.Z puisse entraîner une structure aberrante de la chromatine au niveau des promoteurs et déréguler l'expression des gènes pouvant conduire à des effets cellulaires anormaux. Il serait intéressant d'étudier le potentiel rôle transcriptionnel de la région C-terminal de H2A.Z dans le débalancement de l'expression génique affectant certains processus biologiques importants et l'éventuel développement de maladies chez l'humain.

BIBLIOGRAPHIE

Aasland, R., Stewart, A. F., and Gibson, T. (1996). The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIB. *Trends Biochem. Sci.*, 21:87-88.

Adam, M., Robert, F., Larochelle, M., and Gaudreau, L. (2001). H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol. Cell. Biol.*, 21:6270-6279.

Albert, I., Mavrich, T. N., Tomsho, L. P., Qi, J., Zanton, S. J., Schuster, S. C. and Pugh, B. F. (2007). Translational and rotational settings of H2A.Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature.*, 446:572-576.

Albig, W., and Doenecke, D. (1997). The human histone gene cluster at the *D6S105* locus. *Hum. Genet.*, 101:284-294.

Alen, C., Kent, N. A., Jones, H. S., O'Sullivan, J., Aranda, A., and Proudfoot, N. J. (2002). A role for chromatin remodeling in transcriptional termination by RNA polymerase II. *Mol. Cell*, 10:1441-1452.

Allis, C. D., Glover, C. V., Bowen, J. K., and Gorovsky, M. A. (1980). Histone variants specific to the transcriptionally active, amitotically dividing macronucleus of the unicellular eukaryote, *Tetrahymena thermophila*. *Cell*, 20:609-617.

Altaf, M., Auger, A., Covic, M., and Côté, J. (2009). Connection between histone H2A variants and chromatin remodeling complexes. *Biochem. Cell. Biol.*, 87:35-50.

Altaf, M., Auger, A., Monnet-Saksouk, J., Brodeur, J., Piquet, S., Cramet, M., Bouchard, N., Lacoste, N., Utley, R., Gaudreau, L. and Côté, J. (2010). NuA4-dependent acetylation of nucleosomal histones H4 and H2A directly stimulates incorporation of H2A.Z by the SWR1 complex. *Journal Biol. Chem.*, 285, 15966-15977.

Amor, D. J., Kalitsis, P., Sumer, H., and Choo, K. H. (2004). Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization. *Trends Cell. Biol.*, 14:359-368.

Archambault, J., Lacroute, F., Ruet, A., and Friesen, J. D. (1992). Genetic interaction between transcription elongation factor TFIIS and RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.*, 12:4142-4152.

Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B. C., Love, W. E., and Moudrianakis, E. N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: A tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:10148-10152.

Arents, G., and Moudrianakis, E. N. (1995). The histone fold: A ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11170-11174.

Arndt, K. T., Styles, C. A., and Fink, G. R. (1989). A suppressor of a HIS4 transcriptional defect encodes a protein with homology to the catalytic subunit of protein phosphatases. *Cell*, 56:527-537.

Aso, T., Conaway, J. W., and Conaway, R. C. (1994). Role of core promoter structure in assembly of the RNA polymerase II preinitiation complex. A common pathway for formation of preinitiation intermediates at many TATA and TATA-less promoters. *J. Biol. Chem.*, 269:26575-26583.

Auger, A., Galarneau, L., Altaf, M., Nourani, A., Doyon, Y., Utley, R. T., Cronier, D., Allard, S., and Côté, J. (2008). Eaf1 is the platform for NuA4 molecular assembly that evolutionary links chromatin acetylation to ATP-dependent exchange of histone H2A variants. *Mol. Cell. Biol.*, 28:2257-2270.

Ausio, J., Dong, F., and van Holden, K. E. (1989). Use of selectively trypsinized nucleosome core particles to analyze the role of the histone 'tails' in the stabilization of the nucleosome. *J. Mol. Biol.*, 206:451-463.

Avvakumov, N., Nourani, A., and Côté, J. (2011). Histone chaperones: modulators of chromatin marks. *Mol. Cell*, 41:502-514.

Babiarz, J. E., Halley, J. E. and Rine, J. (2006). Telomeric heterochromatin boundaries require NuA4-dependent acetylation of histone variant H2A.Z in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, 20:700-710.

Badenhorst, P., Voas, M., Rebay, I., and Wu, C. (2002). Biological functions of the ISWI chromatin remodeling complex NURF. *Genes Dev.*, 16:3186-3198.

Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 410:120-124.

Barbaric, S., Luckenbach, T., Schmid, A., Blaschke, D., Horz, W., and Korber, P. (2007). Redundancy of chromatin remodeling pathways for the induction of the yeast *PHO5* promoter *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 282:27610-27621.

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I. and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129:823-837.

Bash, R., and Lohr, D. (2001). Yeast chromatin structure and regulation of GAL gene expression. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 65:197-259.

Batsios, P., Ren, X., Baumann, O., Larochelle, D. A., and Graf, R. (2016a). Src1 is a protein of the inner nuclear membrane interacting with the *Dictyostelium* lamin NE81. *Cells*, 5.

Batsios, P., Meyer, I., and Graf, R. (2016b). Proximity-dependent biotin identification (BioID) in *Dictyostelium amoeba*. *Methods Enzymol.*, 569:23-42.

Bauer, U. M., Daujat, S., Nielsen, S. J., Nightingale, K., and Kouzarides, T. (2002). Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. *EMBO Rep.*, 3:39-44.

Baxevanis, A. D., Arents, G., Moudrianakis, E. N., and Landsman, D. (1995). A variety of DNA-binding and multimeric proteins contain the histone fold motif. *Nucleic Acids Res.*, 23:2685-2691.

Becker, P. B., and Horz, W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.*, 71:247-273.

Belotserkovskaya, R., and Berger, S. L. (1999). Interplay between chromatin modifying and remodeling complexes in transcriptional regulation. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 9:221-230.

Bengal, E., Flores, O., Krauskopf, Reinberg, D., and Aloni, Y. (1991). Role of the mammalian transcription factors IIF, IIS, and IIX during elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.*, 11:1195-1206.

Berger, S. L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12:142-148.

- Berroteran, R. W., Ware, D. E., and Hampsey, M. (1994). The *sua8* suppressors of *Saccharomyces cerevisiae* encode replacements of conserved residues within the largest subunit of RNA polymerase II and affect transcription start site selection similarly to *sua7* (TFIIB) mutations. *Mol. Cell. Biol.*, 14:226-237.
- Bjorklund, S., and Kim, Y. J. (1996). Mediator of transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.*, 21:335-337.
- Boeger, H., Griesenbeck, J., Strattan, J. S., and Kornberg, R. D. (2003). Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter. *Mol. Cell.*, 11:1587-1598.
- Boeger, H., Griesenbeck, J., Strattan, J. S., and Kornberg, R. D. (2004). Removal of promoter nucleosomes by disassembly rather than sliding *in vivo*. *Mol. Cell*, 14:667-673.
- Bortvin, A., and Winston, F. (1996). Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. *Science*, 272:1473-1476.
- Boudreault, A. A., Cronier, D., Selleck, W., Lacoste, N., Utley, R. T., Allard, S., Savard, J., Lane, W. S., Tan, S., and Côté, J. (2003). Yeast enhancer of polycomb defines global Esa1-dependent acetylation of chromatin. *Genes Dev.*, 17:1415-1428.
- Boyer, L. A., Langer, M. R., Crowley, K. A., Tan, S., Denu, J. M., and Peterson, C. L. (2002). Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Mol. Cell*, 10:935-942.
- Bradsher, J. N., Tan, S., McLaury, H. J., Conaway, J. W., and Conaway, R. C. (1993). RNA polymerase II transcription factor SIII. II. Functional properties and role in RNA chain elongation. *J. Biol. Chem.*, 268:25594-25603.
- Brehm, A., Tufteland, K. R., Aasland, R., and Becker, P. B. (2004). The many colours of chromodomains. *Bioessays*, 26:133-140.
- Briggs, S. D., Xiao, T., Sun, Z. W., Caldwell, J. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Allis, C. D., and Strahl, B. D. (2002). Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature*, 418: 498.
- Brown, C. E., Howe, L., Sousa, K., Alley, S. C., Carrozza, M. J., Tan, S., and Workman, J. L. (2001). Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science*, 292:2333-2337.

Bruce, K., Myers, F. A., Mantouvalou, E., Lefevre, P., Greaves, I., Bonifer, C., Tremethick, D. J., Thorne, A. W., and Crane-Robinson, C. (2005). The replacement histone H2A.Z in a hyperacetylated form is a feature of active genes in the chicken. *Nucleic acids research*, 33:5633-5639.

Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., and Sharp, P. A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell*, 56:549-561.

Burton, Z. F., Killeen, M., Sopta, M., Ortolan, L. G., and Greenblatt, J. (1988). RAP30/74: a general initiation factor that binds to RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.*, 8:1602-1613.

Burgess, R. J., and Zhang, Z. (2013). Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 20:14-22.

Cai, Y., Jin, J., Florens, L., Swanson, S. K., Kusch, T., Li, B., Workman, J. L., Washburn, M. P., Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (2005). The mammalian YL1 protein is a shared subunit of the TRRAP/TIP60 histone acetyltransferase and SRCAP complexes. *J. Biol. Chem.*, 280:13665-13670.

Cairns, B. R., Kim, Y. J., Sayre, M. H., Laurent, B. C., and Kornberg, R. D. (1994). A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene-products isolated from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:1950-1954.

Cairns, B. R., Henry, N. L., and Kornberg, R. D. (1996). TFG3/TAF30/ANC1, a component of the yeast SWI/SNF complex that is similar to the leukemogenic proteins ENL and AF-9. *Mol. Cell. Biol.*, 16:3308-3316.

Callard, D., and Mazzolini, L. (1997). Identification of proliferation-induced genes in *Arabidopsis thaliana*. Characterization of a new member of the highly evolutionarily conserved histone H2A.F/Z variant subfamily. *Plant Physiol.*, 115:1385-1395.

Carcamo, J., Buckbinder, L., and Reinberg, D. (1991). The initiator directs the assembly of a transcription factor IID-dependent transcription complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8052-8056.

Carr, A. M., Dorrington, S. M., Hindley, J., Phear, G. A., Aves, S. J., and Nurse, P. (1994). Analysis of a histone H2A variant from fission yeast: evidence for a role in chromosome stability. *Mol. Gen. Genet.*, 245:628-635.

Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M. J., Pilch, D. R., Staudt, D. W., Lee, A., Bonner, R. F., Bonner, W. M., and Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat. Cell. Biol.*, 5:675-679.

Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P. J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H. T., Sedelnikova, O., A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M. J., et al. (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, 296:922-927.

Chakravarthy, S., and Luger, K. (2006). The histone variant macro-H2A preferentially forms "hybrid nucleosomes". *J. Biol. Chem.*, 281:25522-25531.

Chambers, R. S., Dahmus, M. E. (1994). Purification and characterization of a phosphatase from HeLa cells which dephosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, 269:26243-26248.

Chambers, R. S., Wang, B. Q., Burton, Z. F., and Dahmus, M. E. (1995). The activity of COOH-terminal domain phosphatase is regulated by a docking site on RNA polymerase II and by the general transcription factors IIF and IIB. *J. Biol. Chem.*, 270:14962-14969.

Chao, D. M., Gadbois, E. L., Murray, P. J., Anderson, S. F., Sonu, M. S., Parvin, J. D., and Young, R. A. (1996). A mammalian SRB protein associated with an RNA polymerase II holoenzyme. *Nature*, 380:82-85.

Chapman-Smith, A. and Cronan, J. E., Jr. (1999). The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends Biochem. Sci.*, 24:359-363.

Chen, A. L., Kim, E. W., Toh, J. Y., Vashisht, A. A., Rashoff, A. Q., Van, C., Huang, A. S., Moon, A. S., Bell, H. N., Bentolila, L. A., Wohlschlegel, J. A., and Bradley, P. J. (2015). Novel components of the *Toxoplasma* inner membrane complex revealed by BioID. *MBio*. 6:e02357-02314.

Chen, C., Lim, H. H., Shi, J., Tamura, S., Maeshima, K., Surana, U., and Gan, L. (2016). Budding yeast chromatin is dispersed in a crowded nucleoplasm *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.*, 27:3357-3368.

Chen, P., Zhao, J., and Li, G. (2013). Histone variants in development and diseases. *J. Genet. Genomics*, 40:355-365.

Chen, W., and Struhl, K. (1988). Saturation mutagenesis of a yeast his3 "TATA element": genetic evidence for a specific TATA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2691-2695.

Cheung, P., Allis, C. D., and Sassone-Corsi, P. (2000a). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*, 103:263-271.

Cheung, P., Tanner, K. G., Cheung, W. L., Sassone-Corsi, P., Denu, J. M., and Allis, C. D. (2000b). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol. Cell.*, 5:905-915.

Cho, E. J., Takagi, T., Moore, C. R., and Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the Rna polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.*, 11:3319-3326.

Choi, J. K., and Howe, L. J. (2009). Histone acetylation: truth of consequences? *Biochem. Cell. Biol.*, 87:139-150.

Choi, K., Park, C., Lee, J., Oh, M., Noh, B., and Lee, I. (2007). *Arabidopsis* homologs of components of the SWR1 complex regulate flowering and plan development. *Development*, 134:1931-1941.

Choi-Rhee, E., Schulman, H., and Cronan, J. E. (2004). Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase. *Protein Sci.*, 13:3043-3050.

Cisek, L. J., and Corden, J. L. (1989). Phosphorylation of RNA polymerase by murine homologue of the cell-cycle control protein cdc2. *Nature*, 339:679-684.

Clarke, A. S., Lowell, J. E., Jacobson, S. J., and Pillus, L. (1999). Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression. *Mol Cell Biol.*, 19:2515-2526.

Clarkson, M. J., Wells, J. R. E., Gibson, F., Saint, R., and Tremethick, D. J. (1999). Regions of variant histone His2AvD required for *Drosophila* development. *Nature*, 399:694-697.

Coleman-Derr, D., and Zilberman, D. (2012). DNA methylation, H2A.Z, and the regulation of constitutive expression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 77:147-154.

Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (1989). An RNA polymerase II transcription factor has an associated DNA-dependent ATPase (dATPase) activity strongly stimulated by the TATA region of promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:7356-7360.

Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (1993). General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.*, 62:161-690.

Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (1997). General transcription factors for RNA polymerase II. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, 56:327-346.

Conerly, M. L., Teves, S. S., Diolaiti, D., Ulrich, M., Eisenman, R. N., and Henikoff, S. (2010). Changes in H2A.Z occupancy and DNA methylation during B-cell lymphomagenesis. *Genome Res.*, 20:1383-1390.

Côté, J., Quinn, J., Workman, J. L., and Peterson, C. L. (1994). Stimulation of Gal4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science*, 265:53-60.

Cormack, B. P., and Struhl, K. (1992). The TATA-binding protein is required for transcription by all three nuclear RNA polymerases in yeast cells. *Cell*, 69:685-696.

Corona, D. F., Eberharter, A., Budde, A., Deuring, R., Ferrari, S., Varga-Weisz, P., Wilm, M., Tamkun, J., and Becker, P. B. (2000). Two histone fold proteins, CHRAC-14 and CHRAC-16, are developmentally regulated subunits of chromatin accessibility complex (CHRAC). *EMBO J.*, 19:3049-3059.

Corona, D. F., and Tamkun, J. W. (2004). Multiple roles for ISWI in transcription, chromosome organization and DNA replication. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1677:113-119.

Coulombe, C., Poitras, C., Nordell-Markovits, A., Brunelle, M., Lavoie, M. A., Robert, F., and Jacques, P. E. (2014). VAP: a versatile aggregate profiler for efficient genome-wide data representation and discovery. *Nucleic Acids Res.*, 42:485-493.

Cuadrado, A., Corrado, N., Perdiguero, E., Lafarga, V., Munoz-Canoves, P., and Nebreda, A. R. (2011). Essential role of p18Hamlet/SRCAP-mediated histone H2A.Z chromatin incorporation in muscle differentiation. *EMBO J.*, 29:2014-2025.

Dahmus, M. E. (1996). Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, 271:19009-19012.

Davie, J. R., and Spencer, V. A. (1999). Control of histone modifications. *J. Cell. Biochem.*, 32-33:141-148.

Deal, R. B., Topp, C. N., McKinney, E. C., and Meagher, R. B. (2007). Repression of flowering in *Arabidopsis* requires activation of FLOWERING LOCUS C expression by the histone variant H2A.Z. *Plant Cell*, 19:74-83.

De Cesare, D., Jacquot, S., Hanauer, A., and Sassone-Corsi, P. (1998). Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:12202-12207.

DeGennaro, C. M., Alver, B. H., Marguerat, S., Stepanova, E., Davis, C. P., Bahler, J., Park, P. J., and Winston, F. (2013). Spt6 regulates intragenic and antisense transcription, nucleosome positioning, and histone modifications genome-wide in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.*, 33:4779-4792.

Deuring, R., Fanti, L., Armstrong, J. A., Sarte, M., Papoulas, O., Prestel, M., Daubresse, G., Verardo, M., Moseley, S. L., Berloco, M., et al. (2000). The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure in vivo. *Mol. Cell*, 5:355-365.

Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., and Zhou, M. M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, 399:491-496.

Dhillon, N., and Kamakaka, R. T. (2000). A histone variant, Htz1p and a Sir1p-like protein, Esc2p, mediate silencing at HMR. *Mol. Cell*, 6:769-780.

Dhillon, N., Oki, M., Szyjka, S. J., Aparicio, O. M., and Kamakaka, R. T. (2006). H2A.Z functions to regulate progression through the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.*, 26:489-501.

Dominski, Z., and Marzluff, W. F. (1999). Formation of the 3' end of histone mRNA. *Gene*, 239:1-14.

Downs, J.A., Allard S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., Kron, S. J., Jackson, S. P., and Côté, J. (2004). Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol. Cell*, 16:979-990.

Downs, J. A., Lowndes, N. P., and Jackson, S. P. (2000). A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature*, 408:1001-1004.

Doyon, Y., and Côté, J. (2004). The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 14:147-154.

Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W. S., Tan, S., and Côté, J. (2004). Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol. Cell. Biol.*, 24:1884-1896. Drapkin, R., Reardon, J. T., Ansari, A., Huang, J. C., Zawel, L., Ahn, K., Sancar, A., and Reinberg, D. (1994). Dual role of the TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II. *Nature*, 368:769-772.

Dvir, A., Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (1997). A role for TFIIH in controlling the activity of early RNA polymerase II elongation complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:9006-9010.

Dryhurst, D., and Ausio, J. (2014). Histone H2A.Z deregulation in prostate cancer. Cause of effect? *Cancer Metastasis Rev.*, 33:429-439.

Dunican, D. S., McWilliam, P., Tighe, O., Parle-McDermott, A., and Croke, D. T. (2002). Gene expression differences between the microsatellite instability (MIN) and chromosomal instability (CIN) phenotypes in colorectal cancer revealed by high-density cDNA array hybridization. *Oncogene*, 21: 3253-3257.

Dunleavy, E. M., Roche, D., Tagami, H., Lacoste, N., Ray-Gallet, D., Nakamura, Y., Daigo, Y., Nakatani, Y., and Almouzni-Pettinotii, G. (2009). HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell*, 137:485-497.

Durant, M., and Pugh, B. F. (2007). NuA4-directed chromatin transactions throughout the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Mol. Cell Biol.*, 27:5327-5335.

Eaton, M. L., Galani, K., Kang, S., Bell, S. P., and MacAlpine, D. M. (2010). Conserved nucleosome positioning defines replication origins. *Genes & Development*, 24:748-753.

Eberharter, A., and Becker, P. B. (2004). ATP-dependent nucleosome remodelling: factors and functions. *J. Cell Sci.*, 117:3707-3711.

Eberharter, A., Ferrari, S., Langst, G., Straub, T., Imhof, A., Varga-Weisz, P., Wilm, M., and Becker, P. B. (2001). Acf1, the largest subunit of CHRAC, regulates ISWI-induced nucleosome remodelling. *EMBO J.*, 20:3781-3788.

Eickbush, T. H., and Moudrianakis, E. N. (1978). The histone core complex: An octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. *Biochemistry*, 17:4955-4964.

Eisen, J. A., Sweder, K. S., and Hanawalt, P. C. (1995). Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res.*, 23:2715-2723.

Eisenmann, D. M., Dollard, C., and Winston, F. (1989). SPT15, the gene encoding the yeast TATA binding factor TFIID, is required for normal transcription initiation in vivo. *Cell*, 58:1183-1191.

Elfring, L. K., Deuring, R., McCallum, C. M., Peterson, C. L., and Tamkun, J. W. (1994). Identification and characterization of *Drosophila* relatives of the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Mol. Cell. Biol.*, 14:2225-2234.

Elsaesser, S. J., and Allis, C. D. (2010). HIRA and Daxx constitute two independent histone H3.3-containing predeposition complexes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 75:27-34.

Faast, R., Thonglairoam, V., Schulz, T. C., Beall, J., Wells, J. R., Taylor, H., Matthaei, K., Rathjen, P. D., Tremethick, D. J. and Lyons, I. (2001). Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr. Biol.*, 11:1183-1187.

Fan, J. Y., Gordon, F., Luger, K., Hansen, J. C., and Tremethick, D. J. (2002). The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nat. Struct. Biol.*, 9:172-176.

Fang, S. M., and Burton, Z. F. (1996). RNA polymerase II-associated protein (RAP) 74 binds transcription factor (TF) IIB and blocks TFIIB-RAP30 binding. *J. Biol. Chem.*, 271:11703-11709.

Farris, S. D., Rubio, E. D., Moon, J. J., Gombert, W. M., Nelson, B. H., and Krumm, A. (2005). Transcription-induced chromatin remodeling at the c-myc gene involves the local exchange of histone H2A.Z. *J. Biol. Chem.*, 280:25298-25303.

Feaver, W. J., Gileadi, O., Li, Y., and Kornberg, R. D. (1991). CTD kinase associated with yeast RNA polymerase II initiation factor b. *Cell*, 67:1223-1230.

Flores, O., Maldonado, E., Burton, Z., Greenblatt, J., and Reinberg, D. (1988). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. RNA polymerase II-associating protein 30 is an essential component of transcription factor IIF. *J. Biol. Chem.*, 263:10812-10816.

Flores, O., Maldonado, E., and Reinberg, D. (1989). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Factors IIE and IIF independently interact with RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, 264:8913-8921.

Foltz, D. R., Jansen, L. E. T., Bailey, A. O., Yates, J. R., Bassett, E. A., Wood, S., Black, B. E., and Cleveland, D. W. (2009). Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell*, 137:472-484.

Fuchs, M., Gerber, J., Drapkin, R., Sif, S., Ikura, T., Ogryzko, V., Lane, W. S., Nakatani, Y., and Livingston, D. M. (2001). The p400 complex is an essential E1A transformation target. *Cell*, 106:297-307.

Furter-Graves, E. M., Hall, B. D., and Furter, R. (1994). Role of a small RNA pol II subunit in TATA to transcription start site spacing. *Nucleic Acids Res.*, 22:4932-4936.

Fyodorov, D. V., Blower, M. D., Karpen, G. H., and Kadonaga, J. T. (2004). Acfl confers unique activities to ACF/CHRAC and promotes the formation rather than disruption of chromatin in vivo. *Genes Dev.*, 18:170-183.

Gadbois, E. L., Chao, D. M., Reese, J. C., Green, M. R., and Young, R. A. (1997). Functional antagonism between RNA polymerase II holoenzyme and global negative regulator NC2 in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:3145-3150.

Gaji, R. Y., Johnson, D. E., Treeck, M., Wang, M., Hudmon, A., and Arrizabalaga, G. (2015). Phosphorylation of a myosin motor by TgCDPK3 facilitates rapid initiation of motility during *Toxoplasma gondii* egress. *PLoS Pathog.*, 11:e1005268.

Garcia, H., Miecznikowski, J. C., Safina, A., Commane, M., Ruusulehto, A., Kilpinen, S., Leach, R. W., Attwood, K., Li, Y., Degan, S., Omilian, A. R., Guryanova, O., Papantonopoulou, O., Wang, J., Buck, M., Liu, S., Morrison, S., and Gurova, K. V. (2013). Facilitates chromatin transcription complex is an "accelerator" of tumor transformation and potential marker and target of aggressive cancers. *Cell Rep.*, 4:159-173.

Gévry, N., Chan, H. M., Laflamme, L., Livingston, D. M., and Gaudreau, L. (2007). p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev.*, 21:1869-1881.

Gillet, L. C., Navarro, P., Tate, S., Rost, H., Selevsek, N., Reiter, L., Bonner, R., and Aebersold, R. (2012). Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-

independent acquisition : a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol. Cell*, 11:O111016717.

Goodrich, J. A., Hoey, T., Thut, C. J., Admon, A., and Tjian, R. (1993). *Drosophila* TAFII40 interacts with both a VP16 activation domain and the basal transcription factor TFIIB. *Cell*, 75:519-530.

Greaves, I. K., Rangasamy, D., Devoy, M., Marshall Graves, J. A., and Tremethick, D. J. (2006). The X and Y chromosomes assemble into H2A.Z-containing facultative heterochromatin following meiosis. *Mol. Cell. Biol.*, 26:5394-5405.

Greaves, I. K., Rangasamy, D., Ridgway, P., and Tremethick, D. J. (2007). H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:e525-e530.

Greenblatt, J. (1991). RNA polymerase-associated transcription factors. *Trends Biochem. Sci.*, 16:408-411.

Gregory, P. D., Wagner, K., and Horz, W. (2001). Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp. Cell Res.*, 265:195-202.

Grune, T., Brzeski, J., Eberharter, A., Clapier, C. R., Corona, D. F., Becker, P. B., and Muller, C. W. (2003). Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI. *Mol. Cell*, 12:449-460.

Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389:349-352.

Guarente, L., and Hoar, E. (1984). Upstream activation sites of the CYC1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* are active when inverted but not when placed downstream of the "TATA box". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7860-7864.

Guillemette, B., Bataille, A. R., Gévry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F., and Gaudreau, L. (2005). Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol.*, 3, e384.

Guo, C. Y., Mizzen, C., Wang, Y., and Larner, J. M. (2000). Histone H1 and H3 dephosphorylation are differentially regulated by radiation-induced signal transduction pathways. *Cancer Res.*, 60:5667-5672.

Guzman, E., and Lis, J. T. (1999). Transcription factor TFIID is required for promoter melting *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.*, 19:5652-5658.

Ha, I., Roberts, S., Maldonado, E., Sun, X., Kim, L. U., Green, M., and Reinerg, D. (1993). Multiple functional domains of human transcription factor IIB: distinct interactions with two general transcription factors and RNA polymerase II. *Genes Dev.*, 7:1021-1032.

Hahn, S., Buratowski, S., Sharp, P. A., and Guarente, L. (1989). Isolation of the gene encoding the yeast TATA binding protein TFIID: a gene identical to the SPT15 suppressor of Ty element insertions. *Cell*, 58:1173-1181.

Hampsey, M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62:465-503.

Hardy, S., Jacques, PE, Gévry, N., Forest, A., Fortin, ME, Laflamme, L., Gaudreau, L. and Robert, F. (2009). The euchromatic and heterochromatic landscapes are shaped by antagonizing effects of transcription on H2A.Z deposition. *PLoS Genet.*, 5(10): e1000687. doi:10.1371/journal.pgen.1000687.

Hardy, S., and Robert, F. (2010). Random deposition of histone variants: A cellular mistake of a novel regulatory mechanism? *Epigenetics: official journal of the DNA methylation society*, 5:368-372.

Hartzog, G. A., Wada, T., Handa, H., and Winston, F. (1998). Evidence that Spt4, Spt5 and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, 12:357-369.

Harvey, R. P., Whiting, J. A., Coles, L. S., Krieg, P. A., and Wells, J. R. (1983). H2A.F: an extremely variant histone H2A sequence expressed in the chicken embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:2819-2823.

Hassan, A. H., Prochasson, P., Neely, K. E., Galasinski, S. C., Chandy, M., Carrozza, M. J., and Workman, J. L. (2002). Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell*, 111:369-379.

Hatch, C. L., and Bonner, W. M. (1988). Sequence of cDNAs for mammalian H2A.Z, an evolutionarily diverged but highly conserved basal histone H2A isoprotein species. *Nucleic Acids Res.*, 16:1113-1124.

Havas, K., Whitehouse, I., and Owen-Hughes, T. (2001). ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58:673-682.

Hayes, J. J., Clark, D. J., and Wolffe, A. P. (1991). Histone contributions to the structure of DNA in the nucleosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:6829-6833.

Hebbes, T. R., Clayton, A. L., Thorne, A. W., and Crane-Robinson, C. (1994). Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain. *EMBO J.*, 13:1823-1830.

Hebbes, T. R., Thorne, A. W., and Crane-Robinson, C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.*, 7:1395-1402.

Hekmatpanah, D. S., and Young, R. A. (1991). Mutations in a conserved region of RNA polymerase II influence the accuracy of mRNA start site selection. *Mol. Cell. Biol.*, 11:5781-5791.

Henikoff, S., Ahmad, K., Platero, J. S., and van Steensel, B. (2000). Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:716-721.

Henry, N. L., Campbell, A. M., Feaver, W. J., Poon, D., Weil, P. A., and Kornberg, R. D. (1994). TFIIF-TAF-RNA polymerase II connection. *Genes Dev.*, 8:2868-2878.

Heo, K., Kim, H., Choi, S. H., Choi, J., Kim, K., Gu, J., Lieber, M. R., Yang, A. S., and An, W. (2008). FACT-mediated exchange of histone variant H2AX regulated by phosphorylation of H2AX and ADP-ribosylation of Spt16. *Mol. Cell*, 30:86-97.

Hoffmann, A., Chiang, C. M., Oeldeschlager, T., Xie, X. L., Burley, S. K., Nakatani, Y., and Roeder, R. G. (1996). A histone octamer-like structure within TFIID. *Nature*, 380:356-359.

Holstege, F. C., Jennings, E. G., Wyrick, J. J., Lee, T. I., Hengartner, C. J., Green, M. R., Golub, T. R., Lander, E. S., and Young, R. A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell*, 95:717-728.

Houben, A., Wako, T., Furushima-Shimogawara, R., Presting, G., Kunzel, G., Schubert, I. I., and Fukui, K. (1999). Short communication: the cell cycle dependent phosphorylation of histone H3 is correlated with the condensation of plant mitotic chromosomes. *Plant J.*, 18:675-679.

Howman, E. V., Fowler, K. J., Newson, A. J., Redward, S., MacDonald, A. C., Kalitsis, P., and Choo, K. H. (2000). Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:1148-1153.

Hu, G., Cui, K., Northrup, D., Liu, C., Wang, C., Tang, Q., Ge, K., Levens, D., Crane-Robinson, C., and Zhao, K. (2013). H2A.Z facilitates access of active and repressive complexes to chromatin in embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Cell stem cell*, 12:180-192.

Hu, H., Zhou, Q., and Li, Z. (2015). SAS-4 protein in *Trypanosoma brucei* controls life cycle transitions by modulating the length of the flagellum attachment zone filament. *J. Biol. Chem.*, 290:30453-30463.

Hull, M. W., Mckune, K., and Woychik, N. A. (1995). RNA polymerase II subunit RPB9 is required for accurate start site selection. *Genes Dev.*, 9:481-490.

Humbert, S., van Vuuren, H., Lutz, Y., Hoeijmakers, J. H., Egly, J. M., and Moncollin, V. (1994). p44 and p34 subunits of the Btf2/Tfiih transcription factor have homologies with Ssl1, a yeast protein involved in Dna repair. *EMBO J.*, 13:2393-2398.

Imhof, A., and Becker, P. B. (2001). Modifications of the histone N-terminal domains. Evidence for an "epigenetic code"? *Mol. Biotechnol.*, 17:1-13.

Iouzalet, N., Moreau, J. and Mechali, M. (1996). H2A.ZI, a new variant histone expressed during *Xenopus* early development exhibits several distinct features from the core histone H2A. *Nucleic Acids Res.*, 24:3947-3952.

Ishibashi, T., Dryhurst, D., Rose, K. L., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Ausio, J. (2009). Acetylation of vertebrate H2A.Z and its effect on the structure of the nucleosome. *Biochemistry*, 48:5007-5017.

Ishimi, Y., and Kikuchi, A. (1991). Identification and molecular cloning of yeast homolog of nucleosome assembly protein I which facilitates nucleosome assembly *in vitro*. *J Biol Chem.*, 266:7025-7029.

Ito, T., Bulger, M., Pazin, M. J., Kobayashi, R., and Kadonaga, J. T. (1997). ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell*, 90:145-155.

Ito, T., Levenstein, M. E., Fyodorov, D. V., Kutach, A. K., Kobayashi, R., and Kadonaga, J. T. (1999). ACF consists of two subunits, Acf1 and ISWI, that function cooperatively in the ATP-dependent catalysis of chromatin assembly. *Genes Dev.*, 13:1529-1539.

Ivanovska, I., Jacques, P. E., Rando, O. J., Robert, F., and Winston, F. (2011). Control of chromatin structure by Spt6 : different consequences in coding and regulatory regions. *Mol. Cell. Biol.*, 31:531-541.

Izban, M. G., and Luse, D. S. (1992). Factor-stimulated RNA polymerase II transcribes at physiological elongation rates on naked DNA but very poorly on chromatin templates. *J. Biol. Chem.*, 267:13647-13655.

Jackson, J. D., Falciano, V. T., and Gorovsky, M. A. (1996). A likely histone H2A.F/Z variant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biochem. Sci.*, 21:466-467.

Jamai, A., Puglisi, A., and Strubin, M. (2009). Histone chaperone spt16 promotes redeposition of the original h3-h4 histones evicted by elongating RNA polymerase. *Mol. Cell*, 35:377-383.

Jansen, L. E. T., Black, B. E., Foltz, D. R., and Cleveland, D. W. (2007). Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J. Cell. Biol.*, 176:795-805.

Jensen, K., Santisteban, M. S., Urekar, C., and Smith, M. M. (2011). Histone H2A.Z acid patch residues required for deposition and function. *Mol. Genet. Genomics*, 285:287-296.

Jeong, C. J., Yang, S. H., Xie, Y., Zhang, L., Johnson, S. A., and Kodadek, T. (2001). Evidence that Gal11 protein is a target of the Gal4 activation domain in the mediator. *Biochemistry*, 40:9421-9427.

Jeronimo, C., and Robert, F. (2017). The mediator complex: at the nexus of RNA polymerase II transcription. *Trends Cell Biol.*, 27:765-783.

Jeronimo, C., Watanabe, S., Kaplan, C. D., Peterson, C. L., and Robert, F. (2015). The histone chaperones FACT and Spt6 restrict H2A.Z from intragenic locations. *Mol. Cell*, 58:1113–1123.

Jin, Y., Wang, Y., Walker, D. L., Dong, H., Conley, C., et al. (1999). JIL-1: a novel chromosomal tandem kinase implicated in transcriptional regulation in *Drosophila*. *Mol. Cell*, 4:129-135.

John, S., Sabo, P. J., Johnson, T. A., Sung, M. H., Biddie, S. C., Lightman, S. L., Voss, T. C., Davis, S. R., Meltzer, P. S., Stamatoyannopoulos, J. A., and Hager, G. L. (2008). Interaction of the glucocorticoid receptor with the chromatin landscape. *Mol. Cell*, 29:611-624.

Johnson, A. D. (1995). The price of repression. *Cell*, 81:655-658.

Kaplan, C. D., Morris, J. R., Wu, C., and Winston, F. (2000). Spt5 and spt6 are associated with active transcription and have characteristics of general elongation factors in *D. melanogaster*. *Genes Dev.*, 14:2623-2634.

Kaplan, C. D., Laprade, L., and Winston, F. (2003). Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites. *Science*, 301:1096-1099.

Kaufmann, J., and Smale, S. T. (1994). Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex. *Genes Dev.*, 8:821-829.

Kelley, D. E., Stokes, D. G., and Perry, R. P. (1999). CHD1 interacts with SSRP1 and depends on both its chromodomain and its ATPase/helicase-like domain for proper association with chromatin. *Chromosoma*, 108:10-25.

Keogh, M. C., Mennella, T. A., Sawa, C., Berthelet, S., Krogan, N. J., Wolek, A., Podolny, V., Carpenter, L. R., Greenblatt, J. F., Baetz, K., and Buratowski, S. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A variant Htz1 is acetylated by NuA4. *Genes Dev.*, 20:660-665.

Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, 116:259-272.

Kim, D. I., Birendra, K. C., Zhu, W., Motamedchaboki, K., Doye, V., and Roux, K. J. (2014). Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111:E2453-2461.

Kim, Y. J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M. H., and Kornberg, R. D. (1994). A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell*, 77:599-608.

Kingston, R. E., and Narlikar, G. J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.*, 13:2339-2352.

Kobor, M. S., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M. D., Gin, J. W., Jennings, J. L., Link, A. J., Madhani, H. D., and Rhine, J. (2004). A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol.*, 2:E131.

Koh, S. S., Ansari, A. Z., Ptashne, M., and Young, R. A. (1998). An activator target in the RNA polymerase II holoenzyme. *Mol. Cell*, 1:895-904.

Koleske, A. J., and Young, R. A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature*, 368:466-469.

Kornberg, R. D., and Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, 98:285-294.

Kouzarides, T. (2002). Histone methylation in transcriptional control. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12:198-209.

Krasnov, A. N., Mazina, M. Y., Nikolenko, J. V., and Vorobyeva, N. E. (2016). On the way of revealing coactivator complexes cross-talk during transcriptional activation. *Cell Biosci.*, doi: 10.1186/s13578-016-0081-y.

Krebs, J. E., and Peterson, C. L. (2000). Understanding "active" chromatin: a historical perspective of chromatin remodeling. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 10:1-12.

Krogan, N. J., Baetz, K., Keogh, M. C., Datta, N., Sawa, C., Kwok, T. C., Thompson, N. J., Davey, M. G., Pootoolal, J., Hughes, T. R., Emili, A., Buratowski, S., Hieter, P., and Greenblatt, J. F. (2004). Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:13513-13518.

Ku, M., Jaffe, J. D., Koche, R. P., Rheinbay, E., Endoh, M., Koseki, H., Carr, S. A., and Bernstein, B. E. (2012). H2A.Z landscapes and dual modifications in pluripotent and multipotent stem cells underlie complex genome regulatory functions. *Genome biology*, 13:R85.

Kubik, S., Bruzzone, M. J., Jacquet, P., Falcone, J. L., Rougemont, J., and Shore, D. (2015). Nucleosome stability distinguishes two different promoter types at all protein-coding genes in yeast. *Molecular Cell*, 60:422-434.

Kuldell, N. H., and Buratowski, S. (1997). Genetic analysis of the large subunit of yeast transcription factor IIE reveals two regions with distinct functions. *Mol. Cell. Biol.*, 17:5288-5298.

Kusch, T., Florens, L., Macdonald, W. H., Swanson, S. K., Glaser, R. L., Yates, J. RIII., Abmayr, S. M., Washburn, M. P., and Workman, J. L. (2004). Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science*, 306:2084-2087.

Kwon, K., and Beckett, D. (2000). Function of a conserved sequence motif in biotin holoenzyme synthetases. *Protein Sci.*, 9:1530-1539.

Kwon, H., Imbalzano, A. N., Khavari, P. A., Kingston, R. E., and Green, M. R. (1994). Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SWI/SNF complex. *Nature*, 370:477-481.

Lachner, M., O'Carroll, D., Rhea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, 410:116-120.

Ladurner, A. G., Inouye, C., Jain, R., and Tijan, R. (2003). Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol. Cell*, 11:365-376.

Lambert, J. P., Tucholska, M., Go, C., Knight, J. D., and Gingras, A. C. (2015). Proximity biotinylation and affinity purification are complementary approaches for the interactome mapping of chromatin-associated protein complexes. *J. Proteomics*, 118:81-94.

Lambert, J. P., Tucholska, M., Pawson, T., and Gingras, A. C. (2014). Incorporating DNA shearing in standard affinity purification allows simultaneous identification of both soluble and chromatin-bound interaction partners. *J. Proteomics*, 100:55-59.

Lane, M. D., Rominger, K. L., Young, D. L., and Lynen, F. (1964). The enzymatic synthesis of holotranscarboxylase from apotranscarboxylase and (+) -biotin. II. Investigation of the reaction mechanism. *J. Biol. Chem.*, 239:2865-2871.

Larochelle, M., and Gaudreau, L. (2003). H2A.Z has a function reminiscent of an activator required for preferential binding to intergenic DNA. *EMBO J.*, vol. 22, no. 17, 4512-4522.

Leach, T. J., Mazzeo, M., Chotkowski, H. L., Madigan, J. P., Wotring, M. G. and Glaser, R. L. (2000). Histones H2A.Z is widely nonrandomly distributed in chromosome of *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, 30: 23267-72.

Lee, C. K., Shibata, Y., Rao, B., Strahl, B. D., and Lieb, J. D. (2004). Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nat. Genet.*, 36:900-905.

Lee, J. M., and Greenleaf, A. L. (1991). CTD kinase large subunit is encoded by CTK1, a gene required for normal growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene Expr.*, 1:149:167.

Lee, T. I., and Young, R. A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. Rev. Genet.*, 34:77-137.

Lee, Y. C., Min, S., Gim, B. S., and Kim, Y. J. (1997). A transcriptional mediator protein that is required for activation of many RNA polymerase II promoters and is conserved from yeast to humans. *Mol. Cell. Biol.*, 17:4622-4632.

Lemieux, K., and Gaudreau, L. (2004). Targeting of Swi/Snf to the yeast GAL1 UASG requires the Mediator, TAF IIs, and RNA polymerase II. *EMBO J.*, 23:4040-4050.

Li, B., Chen, K., Jiao, Y., Tuteja, G., Schug, J., Li, W., and Kaestner, K. H. (2012). Foxa2 and H2A.Z mediate nucleosome depletion during embryonic stem cell differentiation. *Cell*, 151:1608-1616.

Li, B., Pattenden, S. G., Lee, D., Gutiérrez, J., Chen, J., Seidel, C., Gerton, J., and Workman, J. L. (2005). Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 18385-18390.

Li, J., Moazed, D., and Gygi, S. P. (2002). Association of the histone methyltransferase Set2 with RNA polymerase II plays a role in transcription elongation. *J. Biol. Chem.*, 277:49383-49388.

Li, W. Z., and Sherman, F. (1991). Two types of TATA elements for the *CYC1* gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 11:666-676.

Li, Y., Bjorklund, S., Jiang, Y. W., Lane, W.S., Stillman, D. J., and Kornberg, R. D. (1995). Yeast global transcriptional regulators Sin4 and Rgr1 are components of mediator complex/RNA polymerase II holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:10864-10868.

Liao, S. M., Zhang, J. H., Jeffrey, D. A., Koleske, A. J., Thompson, C. M., Chao, D. M., Viljoen, M., Vanvuuren, H. J. J., and Young, R. A. (1995). A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. *Nature*, 374:193-196.

Liu, X., Li, B., and Gorovsky, M. A. (1996). Essential and nonessential histone H2A variants in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Biol.*, 16:4305-4311. Lu, H., Zawel, L., Fisher, L., Egly, J. M., and Reinberg, D. (1992). Human general transcription factor IIIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature*, 358:641-645.

Lo, W. S., Duggan, L., Tolga, N. C., Emre, Belotserkovskya, R., Lane, W. S., Shiekhatar, R., and Berger, S. L. (2001). Snf1--a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science*, 293:1142-1146.

Lowell, J. E., Kaiser, F., Janzen, C. J., and Cross, G. A. (2005). Histone H2AZ dimerizes with a novel variant H2B and is enriched at repetitive DNA in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.*, 118:5721-5730.

Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389:251-260.

Luk, E., Vu, N. D., Patteson, K., Mizuguchi, G., Wu, W. H., Ranjan, A., Backus, J., Sen, S., Lewis, M., Bai, Y., and Wu, C. (2007). Chz1, a nuclear chaperone for histone H2A.Z. *Mol. Cell*, 25:357-368.

Luk, E., Vu, N. D., Patteson, K., Mizuguchi, G., Wu, W. H., Ranjan, A., Backus, J., and Wu, C. (2010). Stepwise histone replacement by SWR1 requires dual activation with histone H2A.Z and canonical nucleosome. *Cell*, 143:725-736.

Lusser, A., and Kadonaga, J. T. (2003). Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays*, 25:1192-1200.

Maldonado, E., Ha, I., Cortes, P., Weis, L., and Reinberg, D. (1990). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: role of transcription factors IIA, IID, and IIB during formation of a transcription-competent complex. *Mol. Cell. Biol.*, 10:6335-6347.

Maldonado, E., Shiekhatar, R., Sheldon, M., Cho, H., Drapkin, R., Rickert, P., Lees, E., Anderson, C. W., Linn, S., and Reinberg, D. (1996). A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. *Nature*, 381:86-89.

Mao, Z., Pan, L., Wang, W., Sun, J., Shan, S., Dong, Q., Liang, X., Dai, L., Ding, X., Chen, S., Zhang, Z., Zhu, B., Zhou, Z. (2014). Anp32e, a higher eukaryotic histone chaperone directs preferential recognition for H2A.Z. *Cell Res.*, 24:389-399.

March-Diaz, R., Garcia-Dominguez, M., Lozano-Juste, J., Leon, J., Florencio, F. J., and Reyes, J. C. (2008). Histone H2A.Z and homologues of components of the SWR1 complex are required to control immunity in *Arabidopsis*. *Plant*, 53:475-487.

Marshall, N. F., Peng, J., Xie, Z., and Price, D. H. (1996). Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J. Biol. Chem.*, 271:27176-27183.

Martens, J. A., and Winston, F. (2003). Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 13:136-142.

Marzluff, W. F., Gongidi, P., Woods, K. R., Jin, J., and Maltais, L. J. (2002). The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics*, 80:487-498.

Matangkasombut, O., and Buratowski, S. (2003). Different sensitivities of bromodomain factors 1 and 2 to histone H4 acetylation. *Mol. Cell*, 11:353-363.

Mavrich, T. N., Jiang, C., Ioshikhes, I. P., Li, X., Venters, B. J., Zanton, S. J., Tomsho, L. P., Qi, J., Glaser, R. L., Schuster, S.C., Gilmour, D. S., Albert, I. and Pugh, B. F. (2008). Nucleosome organization in the *Drosophila* genome. *Nature*, 453:358-362.

Maxon, M. E., and Tjian, R. (1994). Transcriptional activity of transcription factor IIE is dependent on zinc binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:9529-9533.

McAllaster, M. R., Ikeda, K. N., Lozano-Nunez, A., Anrather, D., Unterwurzacher, V., Gossenreiter, T., Perry, J. A., Crickley, R., Mercadante, C. J., Vaughan, S., and de Graffenried, C. L. (2015). Proteomic identification of novel cytoskeletal proteins associated with TbPLK, an essential regulator of cell morphogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biol. Cell*, 26:3013-3029.

McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., Program, A. E., Shuman, S., and Bentley, D. L. (1997a). 5'-capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev.*, 11:385:3306-3318.

McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G. H., Greenblatt, J., Patterson, S. D., Wickens, M., and Bentley, D. L. (1997b). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature*, 385:357-361.

McKune, K., Moore, P. A., Hull, M. W., and Woychik, N. A. (1995). Six human RNA polymerase subunits functionally substitute for their yeast counterparts. *Mol. Cell. Biol.*, 15:6895-6900.

Mehta, M., Braberg, H., Wang, S., Lozsa, A., Shales, M., Solache, A., Krogan, N. J., and Keogh, M. (2010). Individual lysine acetylations on the N terminus of *Saccharomyces cerevisiae* H2A.Z are highly but not differentially regulated. *The journal of biological chemistry*, 285:39855-39865.

Melcher, K., and Johnson, S. A. (1995). GAL4 interacts with TATA-binding protein and coactivators. *Mol. Cell. Biol.*, 15:2839-2848.

Meneghini, M. D., Wu, M., and Madhani, H. D. (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell*, 112:725-736.

Millar, C. B., Xu, F., Zhang, K. and Grunstein, M. (2006). Acetylation of H2A.Z Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast. *Genes Dev.*, 20:711-722.

Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W. H., Sen, S., and Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2A.Z variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science*, 303:343-348.

Mizuguchi, G., Tsukiyama, T., Wisniewski, J., and Wu, C. (1997). Role of nucleosome remodeling factor NURF in transcriptional activation of chromatin. *Mol. Cell*, 1:141-150.

Mizzen, C. A., Dou, Y., Liu, Y., Cook, R. G., Gorovsky, M. A., and Allis, C. D. (1999). Identification and mutation of phosphorylation sites in a linker histone. Phosphorylation of macronuclear H1 is not essential for viability in tetrahymena. *J. Biol. Chem.*, 274:14533-14536.

Mohawk, J. A., Green, C. B., and Takahashi, J. S. (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annual review of neuroscience*, 35:445-462.

Monteiro, F. L., Baptista, T., Amado, F., Vitorino, R., Jeronimo, C., and Helguero, L. A. (2014). Expression and functionality of histone H2A variants in cancer. *Oncotarget*, 5:3428-3443.

Morrison, A. J., Highland, J., Krogan, N. J., Arbel-Eden, A., Greenblatt, J. F., Haber, J. E., and Shen, X. (2004). INO80 and gamma-H2A.X interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell*, 119:767-775.

Morriswood, B., Havlicek, K., Demmel, L., Yavuz, S., Sealey-Cardona, M., Vidilaseris, K., Anrather, D., Kostan, J., DjinoVIC-Carugo, K., Roux, K. J., and Warren, G. (2013). Novel bilobe components in *Trypanosoma brucei* identified using proximity-dependent biotinylation. *Eukaryot. Cell*, 12:356-367.

Nakatani, Y., Bagby, S., and Ikura, M. (1996). The histone folds in transcription factor TFIID. *J. Biol. Chem.*, 271:6575-6578.

Neely, K. E., Hassan, A. H., Wallberg, A. E., Steger, D. J., Cairns, B. R., Wright, A. P., and Workman, J. L. (1999). Activation domain-mediated targeting of the SWI/SNF complex to promoters stimulates transcription from nucleosome arrays. *Mol. Cell.*, 4:649-655.

Neely, K. E., and Workman, J. L. (2002). Histone acetylation and chromatin remodeling: which comes first? *Mol. Genet. Metab.*, 76:1-5.

Nielsen, S. J., Schneider, R., Bauer, U. M., Bannister, A. J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R. E., and Kouzarides, T. (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*, 412:561-565.

Nock, A., Ascano, J. M., Barrero, M. J., and Malik, S. (2012). Mediator-regulated transcription through the +1 nucleosome. *Mol. Cell*, 48:837-848.

Novina, C. D., and Roy, A. L. (1996). Core promoters and transcriptional control. *Trends Genet.*, 12:351-355.

Ohkuma, Y., Hashimoto, S., Wang, C. K., Horikoshi, M., and Roeder, R. G. (1995). Analysis of the role of TFIIE in basal transcription and TFIIH-mediated carboxy-terminal domain phosphorylation through structure-function studies of TFIIE-alpha. *Mol. Cell. Biol.*, 15:4856-4866.

Ohkuma, Y., and Roeder, R. G. (1994). Regulation of TFIIH ATPase and kinase activities by TFIIE during active initiation complex formation. *Nature*, 368:160-163.

Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.*, 10:2657-2683.

Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C. H., Luse, D. S., and Reinberg, D. (1998). FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell*, 92:105-116.

Ossipow, V., Tassan, J.-P., Nigg, E. A., and Schibler, U. (1995). A mammalian RNA polymerase II holoenzyme containing all components required for promoter-specific transcription initiation. *Cell*, 83:137-146.

Pandey, N. B., Chodchoy, N., Liu, T. J., and Marzluff, W. F. (1990). Introns in histone genes alter the distribution of 3 ends. *Nucleic Acids Res.*, 18:3161-3170.

Papamichos-Chronakis, M., Watanabe, S., Rando, O. J. and Peterson, C. L. (2011). Global regulation of H2A.Z localization by the INO80 chromatin-remodeling enzyme is essential for genome integrity. *Cell*, 144:200-213.

Park, J. M., Kim, H. S., Han, S. J., Hwang, M. S., Lee, Y. C., and Kim, Y. J. (2000). In vivo requirement of activator-specific binding targets of mediator. *Mol. Cell. Biol.*, 20:8709-8719.

Park, Y. J., Chodaparambil, J. V., Bao, Y., McBryant, S. J., and Luger, K. (2005). Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding. *J. Biol. Chem.*, 280:1817-1825.

Park, Y. J., Dyer, P. N., Tremethick, D. J., and Luger, K. (2004). A new fluorescence resonance energy transfer approach demonstrates that the histone variant H2A.Z stabilizes the histone octamer within the nucleosome. *J. Biol. Chem.*, 279:24274-24282.

Paro, R., and Hogness, D. S. (1991). The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:263-267.

Paule, M. R., and White, R. J. (2000). Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.*, 28:1283-1298.

Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., and Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.*, 10:886-895.

Peterson, C. L. (2002). HDAC's at work: everyone doing their part. *Mol. Cell*, 9:921-922.

Peterson, C. L., Dingwall, A., and Scott, M. P. (1994). 5 SWI/SNF gene-products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:2905-2908.

Peterson, C. L., and Tamkun, J. W. (1995). The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine? *Trends Biochem. Sci.*, 20:143-146.

Pinto, I., Ware, D. E., and Hampsey, M. (1992). The yeast SUA7 gene encodes a homolog of human transcription factor TFIIB and is required for normal start site selection in vivo. *Cell*, 68:977-988.

Placek, B. J., Harrison, L. N., Villers, B. M., and Gloss, L. M. (2005). The H2A.Z/H2B dimer is unstable compared to the dimer containing the major H2A isoform. *Protein Sci.*, 14:514-522.

Powell, W., and Reines, D. (1996). Mutations in the second largest subunit of RNA polymerase II cause 6-azauracil sensitivity in yeast and increased transcriptional arrest in vitro. *J. Biol. Chem.*, 271:6866-6873.

Price, D. H., Sluder, A. E., and Greenleaf, A. L. (1989). Dynamic interaction between a *Drosophila* transcription factor and RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.*, 9:1465-1475.

Qiu, J. J., Guo, J. J., Lv, T. J., Jin, H. Y., Ding, J. X., Feng, W. W., Zhang, Y., and Hua, K. Q. (2013). Prognostic value of centromere protein-A expression in patients with epithelial ovarian cancer. *Tumour Biol.*, 34:2971-2975.

Raisner, R. M., Hartley, P. D., Meneghini, M. D., Bao, M. Z., Liu, C. L., Schreiber, S. L., Rando, O. J., and Madhani, H.D. (2005). Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell*, 123:233-248.

Rangasamy, D. (2010). Histone variant H2A.Z can serve as a new target for breast cancer therapy. *Curr. Med. Chem.*, 17: 3155-3161.

Rangasamy, D., Berven, I., Ridgway, P., and Tremethick, D. J. (2003). Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. *EMBO J.*, 22:1599-1607.

Rangasamy, D., Greaves, I., and Tremethick, D. J. (2004). RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11: 650-655.

Rasmussen, T. P., Huang, T., Mastrangelo, M. A., Loring, J., Panning, B., and Jaenisch, R. (1999). Messenger RNAs encoding mouse histone macroH2A1 isoforms are expressed at similar levels in male and female cells and result from alternative splicing. *Nucleic Acids Res.*, 27:3685-3689.

Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., and Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2A.X and H2A.Z. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12:162-169.

Reinberg, D., Orphanides, G., Ebright, R., Akoulitchiev, S., Carcamo, J., et al. (1998). The RNA polymerase II general transcription factors: past, present, and future. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 63:83-103.

Reinke, H., and Horz, W. (2003). Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated *PHO5* promoter. *Mol. Cell*, 11:1599-1607.

Rhee, H. S., and Pugh, B. F. (2012). Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature*, 483:295-301.

Ridgway, P., Brown, K. D., Rangasamy, D., Svensson, U., and Tremethick, D. J. (2004). Unique residues on the H2A.Z containing nucleosome surface are important for *Xenopus laevis* development. *J. Biol. Chem.*, 279:43815-43820.

Roeder, R. G. (1998). Role of general and gene-specific cofactors in the regulation of eukaryotic transcription. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 63:201-218.

Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., and Bonner, W. M. (1998). DNA doublestranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.*, 273:5858-5868.

Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. *J. Cell. Biol.*, 146:905-916.

Roth, S. Y., Denu, J. M., and Allis, C. D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*, 70:81-120.

Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M., and Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J. Cell. Biol.*, 196:801-810.

Roy, R., Schaeffer, L., Humbert, S., Vermeulen, W., Weeda, G., and Egly, J. M. (1994). The DNA-dependent ATPase activity associated with the class II basic transcription factor BTF2/TFIIH. *J. Biol. Chem.*, 269:9826-9832.

Roy, A., Du, H., Gregor, P., Novina, C., Martinez, E., and Roeder, R. (1997). Cloning of and inr- and E-box-binding protein, TFII-I, that interacts physically and functionally with USF1. *EMBO J.*, 16:7091-7104.

Roy, A. L., Malik, S., Meisterernst, M., and Roeder, R. G. (1993). An alternative pathway for transcription initiation involving TFII-I. *Nature*, 365:355-359.

Ruhl, D. D., Jin, J., Cai, Y., Swanson, S., Florens, L., Washburn, M. P., Conaway, R. C., Conaway, J. W., and Chrivia, J. C. (2006). Purification of a human SRCAP complex that remodels chromatin by incorporating the histone variant H2A.Z into nucleosomes. *Biochemistry*, 45:5671-5677.

Santisteban, M. S., Kalashnikova, T., and Smith, M. M. (2000). Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell*, 103:411-422.

Sarcinella, E., Zuzarte, P. C., Lau, Priscilla, N. I., Draker, R., and Cheung, P. (2007). Monoubiquitylation of H2A.Z distinguishes its association with euchromatin or facultative heterochromatin. *Molecular and cellular biology*, 27:6457-6468.

Sassone-Corsi, P., Mizzen, C. A., Cheung, P., Crosio, C., Monaco, L., et al. (1999). Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science*, 285:886-891.

Sauer, F., Fondell, J. D., Ohkuma, Y., Roeder, R. G., and Jackle, H. (1995). Control of transcription by Kruppel through interactions with TFIIB and TFIIE beta. *Nature*, 375:162-164.

Sayre, M. H., Tschochner, H., and Kornberg, R. D. (1992). Reconstitution of transcription with five purified initiation factors and RNA polymerase II from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 267:23376-23382.

Schaeffer, L., Moncollin, V., Roy, R., Staub, A., Mezzina, M., Sarasin, A., Weeda, G., Hoeijmakers, J. H., and Egly, J. M. (1994). The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *EMBO J.*, 13:2388-2392.

Schaeffer, L., Roy, R., Humbert, S., Moncollin, V., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H., Chambon, P., and Egly, J. M. (1993). DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science*, 260:58-63.

Schones, D. E., Cui, K., Cuddapah, S., Roh, T. Y., Barski, A., Wang, Z., Wei, G., and Zhao, K. (2008). Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell*, 132:887-898.

Schwabish, M. A., and Struhl, K. (2004). Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.*, 24:10111-10117.

Scully, R., Anderson, S. F., Chao, D. M., Wei, W., Ye, L., Young, R. A., Livingston, D. M., and Parvin, J. D. (1997). BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:5605-5610.

Serizawa, H., Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (1992). A carboxyl-terminal-domain kinase associated with RNA polymerase II transcription factor delta from rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:7476-7480.

Serizawa, H., Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (1993). Multifunctional RNA polymerase II initiation factor delta from rat liver. Relationship between carboxyl-terminal domain kinase, ATPase, and DNA helicase activities. *J. Biol. Chem.*, 268:17300-17308.

Sharma, V. M., Li, B., and Reese, J. C. (2003). SWI/SNF-dependent chromatin remodeling of RNR3 requires TAF(II)s and the general transcription machinery. *Genes Dev.*, 17:502-515.

Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A., and Wu, C. (2000). A chromatin remodeling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature*, 406:541-544.

Shen, X., Ranallo, R., Choi, E., and Wu, C. (2003). Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin remodeling. *Mol. Cell*, 12:147-155.

Singer, V. L., Wobbe, C. R., and Struhl, K. (1990). A wide variety of DNA sequences can functionally replace a yeast TATA element for transcriptional activation. *Genes Dev.*, 4:636-645.

Skene, P. J. and Henikoff, S. (2013). Histone variants in pluripotency and disease. *Development*, 140, 2513-2524.

Smale, S. T., and Baltimore, D. (1989). The "initiator" as a transcription control element. *Cell*, 57:103-113.

Smale, S. T., Jain, S., Kaufmann, J., Emami, K. H., Lo, K., and Garraway, I. P. (1998). The initiator element: a paradigm for core promoter heterogeneity within metazoan protein-coding genes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 63:21-31.

Stargell, L. A., Bowen, J., Dadd, C. A., Dedon, P. C., Davis, M., Cook, R. G., Allis, C. D., and Gorovsky, M. A. (1993). Temporal and spatial association of histone H2A variant hv1 with transcriptionally competent chromatin during nuclear development in *Tetrahymena thermophila*. *Genes Dev.*, 7:2641-2651.

Steinmetz, A. J. (1997). Pre-mRNA processing and the CTD of RNA polymerase II: the tail that wags the dog? *Cell*, 89:491-494.

Stokes, D. G., Tartof, K. D., and Perry, R. P. (1996). CHD1 is concentrated in interbands and puffed regions of *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7137-7142.

Stoler, S., Keith, K. C., Curnick, K. E., and Fitzgerald-Hayes, M. (1995). A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis. *Genes Dev.*, 9:573-586.

Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403:41-45.

Struhl, K. (1984). Genetic properties and chromatin structure of the yeast gal regulatory element: an enhancer-like sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7865-7869.

Struhl, K. (1995). Yeast transcriptional regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Genet.*, 29:651-674.

Subramanian, V., Mazumder, A., Surface, L. E., Butty, V. L., Fields, P. A., Alwan, A., Torrey, L., Thai, K. K., Levine, S. S., Bathe, M., and Boyer, L. A. (2013). H2A.Z acidic patch couples chromatin dynamics to regulation of gene expression programs during ESC differentiation. *PloS genetics*, 9:e1003725.

Subramanian, V., Fields, P. A., and Boyer, L. A. (2015). H2A.Z: a molecular rheostat for transcriptional control. *F1000Prime Reports*, 7:01.

Sudarsanam, P., and Winston, F. (2000). The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet.*, 16:345-351.

Sullivan, K. F. (2001). A solid foundation: functional specialization of centromeric chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 11:182-188.

Sun, Z. W., and Hampsey, M. (1995). Identification of the gene (SSU71/TFG1) encoding the largest subunit of transcription factor TFIIF as a suppressor of a TFIIB mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:3127-3131.

Suto, R. M., Clarkson, M. J., Tremethick, D. J., and Luger, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat. Struct. Biol.*, 7:1121-1124.

Svetelits, A., Gévry, N., Grondin, G., and Gaudreau, L. (2010). H2A.Z overexpression promotes cellular proliferation of breast cancer cells. *Cell cycle*, 9:364-370.

Swaminathan, J., Baxter, E. M., and Corces, V. G. (2005). The role of histone H2Av variant replacement and histone H4 acetylation in the establishment of *Drosophila* heterochromatin. *Genes Dev.*, 19:65-76.

Tan, S. Y., Aso, T., Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (1994). Roles for both the RAP30 and RAP74 subunits of transcription factor IIF in transcription initiation and elongation by RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, 269:25684-25691.

Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell*, 116:51-61.

Takahashi, K., Chen, E. S., and Yanagida, M. (2000). Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A-like protein in fission yeast. *Science*. 288:2215-2219.

Thakar, A., Gupta, P., Ishibashi, T., Finn, R., Silva-Moreno, B., Uchiyama, S., Fukui, K., Tomschik, M., Ausio, J., and Zlatanova, J. (2009). H2A.Z and H3.3 histone variants affect nucleosome structure: biochemical and biophysical studies. *Biochemistry*, 48:10852-10857.

Thambirajah, A. A., Dryhurst, D., Ishibashi, T., Li, A., Maffey, A. H., and Ausio, J. (2006). H2A.Z stabilizes chromatin in a way that is dependent on core histone acetylation. *J. Biol. Chem.*, 281:20036-20044.

Thatcher, T. H., and Gorovsky, M. A. (1994). Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3 and H4. *Nucleic Acids Res.*, 22:174-179.

Thomson, S., Clayton, A. L., Hazzalin, C. A., Rose, S., Barratt, M. J., and Mahadevan, L. C. (1999). The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *EMBO J.*, 18:4779-4793.

Tramantano, M., Sun, L., Au, C., Labuz, D., Liu, Z., Chou, M., Shen, C., and Luk, E. (2016). Constitutive turnover of histone H2A.Z at yeast promoters requires the preinitiation complex. *eLife*, doi: 10.7554/eLife.14243.

Tran, H. G., Steger, D. J., Iyer, V. R., and Johnson, A. D. (2000). The chromo domain protein chd1p from budding yeast is an ATP-dependent chromatin-modifying factor. *EMBO J.*, 19:2323-2331.

Tsukiyama, T. (2002). The *in vivo* functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 3:422-429.

Tsukiyama, T., Daniel, C., Tamkun, J., and Wu, C. (1995). ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor. *Cell*, 83:1021-1026.

Turner, B. M. (1993). Decoding the nucleosome. *Cell*, 75:5-8.

Turner, B. M. (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell*, 111:285-291.

Updike, D. L., and Mango, S. E. (2006). Temporal regulation of foregut development by HTZ-1/H2A.Z and PHA-4/FoxA. *PLoS Genet.*, 2:e161.

Usheva, A., and Shenk, T. (1994). TATA-binding protein-independent initiation: YY1, TFIIB, and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA. *Cell*, 76:1115-1121.

van Attikum, H., Fritsch, O., and Gasser, S. M. (2007). Distinct roles for SWR1 and INO80 chromatin remodeling complexes at chromosomal double-strand breaks. *EMBO J.*, 26:4113-4125.

van Daal, A., and Elgin, S. C. (1992). A histone variant, H2AvD, is essential in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Cell*, 3:593-602.

van Daal, A., White, E. M., Gorovsky, M. A., and Elgin, S. C. (1988). Drosophila has a single copy of the gene encoding a highly conserved histone H2A variant of the H2A.F/Z type. *Nucleic Acids Res.*, 16:7487-7497.

Van Dyke, M. W., Roeder, R. G., and Sawadogo, M. (1988). Physical analysis of transcription preinitiation complex assembly on a class II gene promoter. *Science*, 241:1335-1338.

van Vuuren, A. J., Vermeulen, W., Ma, L., Weeda, G., Appeldoorn, E., Jaspers, N. G., van der Eb, A. J., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H., Humbert, S., et al. (1994). Correction of xeroderma pigmentosum repair defect by basal transcription factor BFT2 (TFIIH). *EMBO J.*, 13:1645-1653.

Vaquero, A., Loyola, A., and Reinberg, D. (2003). The constantly changing face of chromatin. *Sci. Aging Knowledge Environ* 2003, RE4.

Varga-Weisz, P. D., Wilm, M., Bonte, E., Dumas, K., Mann, M., and Becker, P. B. (1997). Chromatin-remodeling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature*, 388:598-602.

Varnaité, R., and MacNeill, S. A. (2016). Meet the neighbours: mapping local protein interactomes by proximity-dependent labeling with BioID. *Proteomics*, 10.1002/pmic.201600123

Verrijzer, C. P., and Tjian, R. (1996). TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem. Sci.*, 21:338-342.

Voth, W. P., Takahata, S., Nishikawa, J. L., Metcalfe, B. M., Naar, A. M., and Stillman, D. J. (2014). A role for FACT in repopulation of nucleosomes at inducible genes. *PLoS One*, 9, e84092.

Walker, J., Chen, T. A., Sterner, R., Berger, M., Winston, F., and Allfrey, V. G. (1990). Affinity chromatography of mammalian and yeast nucleosomes. Two modes of binding of transcriptionally active mammalian nucleosomes to organomercurial-agarose columns, and contrasting behavior of the active nucleosomes of yeast. *J. Biol. Chem.*, 265:5736-5746.

Wang, A. Y., Aristizabal, M. J., Ryan, C., Krogan, N. J., and Kobor, M. S. (2011). Key functional regions in the histone variant H2A.Z C-terminal docking domain. *Mol. Cell. Biol.*, 31:3871-3884.

Wang, W., Carey, M., and Gralla, J. D. (1992). Polymerase II promoter activation: closed complex formation and ATP-driven start site opening. *Science*, 255:450-453.

Wang, W. D., Côté, J., Xue, Y., Zhou, S., Khavari, P. A., Biggar, S. R., Muchardt, C., Kalpana, G. V., Goff, S. P., Yaniv, M., Workman, J. L., and Crabtree, G. R. (1996a). Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *EMBO J.*, 15:5370-5382.

Wang, W. D., Côté, J., Xue, Y., Zhou, S., Kuo, A., Cairns, B. R., and Crabtree, G. R. (1996b). Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes. *Genes & Dev.*, 10:2117-2130.

Wang, Z., Svejstrup, J. Q., Feaver, W. J., Wu, X., Kornberg, R. D., and Friedberg, E. C. (1994). Transcription factor b (TFIIH) is required during nucleotide-excision repair in yeast. *Nature*, 368:74-76.

Wang, Z., Buratowski, S., Svejstrup, J. Q., Feaver, W. J., Wu, X., Kornberg, R. D., Donahue, T. F., and Friedberg, E. C. (1995). The yeast TFB1 and SSL1 genes, which encode subunits of transcription factor IIH are required for nucleotide excision repair and RNA polymerase II transcription. *Mol. Cell. Biol.*, 15:2288-2293.

Weber, C. M., Ramachandran, S., and Henikoff, S. (2014). Nucleosomes are context-specific, H2A.Z-modulated barriers to RNA polymerase. *Mol. Cell*, 53:819-830.

White, C. L., Suto, R. K., and Luger, K. (2001). Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *Embo J.*, 20:5207-5218.

Whitfield, M. L., Zheng, L. X., Baldwin, A., Ohta, T., Hurt, M. M., and Marzluff, W. F. (2000). Stem-loop binding protein, the protein that binds the 3' end of histone mRNA, is cell cycle regulated by both translational and posttranslational mechanisms. *Mol. Cell. Biol.*, 20:4188-4198.

Wild, T., and Cramer, P. (2012). Biogenesis of multisubunit RNA polymerases. *Trends Biochem. Sci.*, 37: 99-105.

Wilson, C. J., Chao, D. M., Imbalzano, A. N., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E., and Young, R. A. (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell*, 84:235-244.

Wobbe, C. R., and Struhl, K. (1990). Yeast and human TATA-binding proteins have nearly identical DNA sequence requirements for transcription *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.*, 10:3859-3867.

Wong, M. M., Cox, L. K., and Chrivia, J. C. (2007). The chromatin remodeling protein, SRCAP, is critical for deposition of the histone variant H2A.Z at promoters. *J. Biol. Chem.*, 282:26132-26139.

Woodcock, C. L., and Dimitrov, S. (2001). Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 11:130-135.

Workman, J. L., and Kingston, R. E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:545-579.

Workman, J. L., and Langmore, J. P. (1985). Nucleoprotein hybridization: a method for isolating specific genes as high molecular weight chromatin. *Biochemistry*, 24:7486-7497.

Woychik, N. A., and Young, R. A. (1994). Exploring RNA polymerase II structure and function, p. 227-242. In R. C. Conaway and J. W. Conaway (ed.), *Transcription: mechanisms and regulation*. Raven Press, New York, N. Y.

Wu, J., Suka, N., Carlson, M., and Grunstein, M. (2001). TUP1 utilizes histone H3/H2B-specific HDA1 deacetylase to repress gene activity in yeast. *Mol. Cell.*, 7:117-126.

Wu, W. H., Alami, S., Luk, E., Wu, C. H., Sen, S., Mizuguchi, G., Wei, D., and Wu, C. (2005). Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12:1064-1071.

Wu, Y., Reece, R. J., and Ptashne, M. (1996). Quantitation of putative activator-target affinities predicts transcriptional activating potentials. *EMBO J.*, 15:3951-3963.

Xiao, H., Sandaltzopoulos, R., Wang, H. M., Hamiche, A., Ranallo, R., Lee, K. M., Fu, D., and Wu, C. (2001). Dual functions of largest NURF subunit NURF301 in nucleosome sliding and transcription factor interactions. *Mol. Cell*, 8:531-543.

Xiao, T., Hall, H., Kizer, K. O., Shibata, Y., Hall, M. C., Borchers, C. H., and Strahl, B. D. (2003). Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast. *Genes Dev.*, 17:654-663.

Xie, X. L., Kokubo, T., Cohen, S. L., Mirza, U. A., Hoffmann, A., Chait, B. T., Roeder, R. G., Nakatani, Y., and Burley, S. K. (1996). Structural similarity between TAFs and the heterotetrameric core of the histone octamer. *Nature*, 380:316-322.

Yen, K., Vinayachandran, V., and Pugh, B. F. (2013). SWR-C and INO80 chromatin remodelers recognize nucleosome-free regions near +1 nucleosomes. *Cell*, 154:1246-1256.

Yoda, K., Ando, S., Morishita, S., Houmura, K., Hashimoto, K., Takeyasu, K., and Okazaki, T. (2000). Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:7266-7271.

Yuan, G. C., Liu, Y. J., Dion, M. F., Slack, M. D., Wu, L. F., Altschuler, S. J., and Rando, O. J. (2005). Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science*, 309:626-630.

Yudkovsky, N., Logie, C., Hahn, S., and Peterson, C. L. (1999). Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex by transcriptional activators. *Genes Dev.*, 13:2369-2374.

Yue, Z., Maldonado, E., Pillutla, R., Cho, H., Reinberg, D., and Shatkin, A. J. (1997). Mammalian capping enzyme complements mutant *Saccharomyces cerevisiae* lacking mRNA guanylyltransferase and selectively binds the elongating form of RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:12898-12903.

Yuryev, A., Patturajan, M., Litingtung, Y., Joshi, R. V., Gentile, C., Gebara, M., and Corden, J. L. (1996). The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:6975-6980.

Zemach, A., McDaniel, I. E., Silva, P., and Zilberman, D. (2010). Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science*, 328:916-919.

Zhang, D. E., and Nelson, D. A. (1988). Histone acetylation in chicken erythrocytes. Rates of acetylation and evidence that histones in both active and potentially active chromatin are rapidly modified. *Biochem. J.*, 250:233-240.

Zhang, G., Campbell, E. A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., and Darst, S. A. (1999). Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell*, 98:811-824.

Zhang, H., Richardson, D. O., Roberts, D. N., Utley, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Côté, J. And Cairns, B. R. (2004). The Yaf9 component of the SWR1 and NuA4 complexes is required for proper gene expression, histone H4 acetylation, and Htz1 replacement near telomeres. *Mol. Cell. Biol.*, 24:9424-9436.

Zhang, H., Roberts, D. N., and Cairns, B. R. (2005). Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell*, 123, 219-231.

Zhu, A. H., and Kuziora, M. A. (1996). Homeodomain interaction with the beta subunit of the general transcription factor TFIIE. *J. Biol. Chem.*, 271:20993-20996.

Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T., and Henikoff, S. (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature*, 456:125-129.

Zlatanova, J., Leuba, S. H., and van Holde, K. (1999). Chromatin structure revisited. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 9:245-255.

Zlatanova, J., and Thakar, A. (2008). H2A.Z: view from the top. *Structure*, 16:166-179.

